

TRATAT DE
MICROBIOLOGIE
GENERALA



G. ZARNEA

de TRATAT
MICROBIOLOGIE
GENERALĂ

VIROLOGIE GENERALĂ
ANATOMIE BACTERIANĂ

Cuprins

PREFAȚĂ	11
ORGANIZAREA GENETICĂ A BACTERIILOR	
ARHITECTURA MOLECULARĂ A ACIZILOR NUCLEICI	15
Componentele structurale ale ADN	15
Structura primară a ADN	16
Structura secundară a ADN. Modelul Watson—Crick	17
Abateri de la modelul Watson—Crick	22
Conformațiile moleculelor de ADN dublu helical	22
ADN—Z și semnificația sa biologică potențială	24
Proprietățile fizico-chimice ale ADN și tehnicile de determinare ale acestora	27
Funcțiile ADN ca material genetic	39
Argumente privind rolul genetic al acizilor nucleici	42
ENZIMELE CARE MODIFICĂ TOPOLOGIA ADN. TOPOIZOMERAZELE ȘI STRUCTURA TERȚIARĂ A ADN	45
Proprietățile topologice ale ADN. Conceptul de „suprarăsucire”	47
Topoizomerazele	49
Rolul modificărilor topologice ale ADN	53
GENOMUL BACTERIAN	56
Cromosomul bacterian	56
Structura moleculară	58
Ipoteze privind modul de „impachetare” a cromosomului bacterian	59
Structura genetică a bacteriilor	64
Genele criptice și rolul lor în evoluția microorganismelor	68
Interacțiuni genetice în celula bacteriană	69
ELEMENTELE GENETICE ACCESORII	71
PLASMIDELE	74
Clasificarea plasmidelor	75
Structura moleculară a plasmidelor	77
Structura genetică și funcțiile plasmidelor	78
Replierea și segregarea plasmidelor	81

Relațiile dintre plasmide	86
Natura și originea plasmidelor	88
Evoluția plasmidelor	88
Semnificația biologică a plasmidelor	90
Utilizări practice ale plasmidelor	90
Plasmidele F	94
Plasmidele R	97
Plasmidele „Col” și colicinele	111
ELEMENTELE GENETICE TRANPOZABILE ALE BACTERIILOR	120
Modelul general de structură al elementelor genetice transpozabile	122
Secvențele de inserție	122
Transpozonii	124
Fagul Mu	128
Proprietățile generale ale elementelor genetice transpozabile și consecințele prezenței lor. Transpoziția	133
Mecanismul molecular al transpoziției	142
Semnificația biologică generală a elementelor genetice transpozabile	146
Natura și originea elementelor genetice transpozabile	148
HĂRȚILE GENETICE ALE BACTERIILOR	152
Harta genetică a <i>E. coli</i> K12	159
STRUCTURA FINĂ A GENEI	163
FUNCȚIILE MATERIALULUI GENETIC	
REPLICAREA ADN	175
Modul de replicare a ADN	176
Enzimologia replicării ADN la bacterii	178
Biochimia polimerizării ADN	181
Etapile replicării ADN	183
Modele de replicare a ADN	190
Replicarea cromosomului bacterian	198
REPARAȚIA GENETICĂ	202
Mecanismele de reparare genetică la bacterii	203
Fotoreactivarea	205
Reparația prin excizie și resinteză	208
Reparația prin recombinare postreplicativă	211
Sistemul reparator inductibil „SOS”	215
Răspunsul reparator adaptativ	227
Semnificația biologică a sistemelor de reparare a ADN	229
Evoluția sistemelor de reparare a ADN	232
CODUL GENETIC	234
Structura codului genetic	235
Descifrarea codului genetic	238
Influența particularităților codului asupra utilizării informației genetice	253
Codul genetic primitiv	254
BIOSINTEZA PROTEINELOR	262
Tranzierea informației genetice	263
Evidențierea transcrierii genetice. „Genele în acțiune”	275

Traducerea informației genetice	280
Fazele procesului de traducere genetică	285
Fidelitatea proceselor de replicare, transcriere și traducere genetică	297

VARIABILITATE ȘI EVOLUȚIE LA BACTERII

MUTAȚIILE ȘI MUTAGENEZA	305
Tipurile de mutații	306
Mecanismele moleculare ale mutațiilor spontane	311
Mutageneza indusă	312
Efectul mutațiilor asupra traducerii informației genetice	318
Efectele mutațiilor asupra fenotipului bacteriilor	322
Teste bacteriene pentru detectarea efectului mutagen și cancerigen al unor substanțe	329
TRANSFERUL DE GENE LA BACTERII	334
Mecanismul transportului ADN prin membranele celulei bacteriene	335
TRANSFORMAREA GENETICĂ	341
Fazele procesului de transformare genetică	346
CONJUGAREA BACTERIANĂ	354
Fazele procesului de conjugare	356
Genetica și biochimia etapelor preliminare transferului de ADN	359
Etapile consecutive transferului	364
Rolul feromonilor sexuali	369
Conjugarea indusă de transpozoni	373
„Conjugarea” micelială	373
SEXDUȚIA	376
TRANSDUCȚIA FAGICĂ	380
Transducția fagică specializată	381
Fagii lambda transductori	390
Transducția fagică generalizată	394
Transducția abortivă	397
TRANSFERUL DE GENE ASOCIAT CU FAGII	400
CAPSDUCȚIA	401
CONVERSIA FAGICĂ	402
TRANSFEȚIA	404
FUZIUNEA PROTOPLASTILOR BACTERIENI	407
TRANSFUZIA GENETICĂ	412
TRANSFORMAREA GENETICĂ A PROTOPLASTILOR	412
INTERACȚIUNEA PROTOPLASTILOR CU LIPOSOMII	413
RECOMBINAREA GENETICĂ	416
Mecanismele recombinării genetice	418
Modele moleculare ale recombinării genetice	422

STABILITATEA ȘI VARIABILITATEA GENETICĂ LA BACTERII ÎN NATURĂ	433
Factorii determinanți ai stabilității genetice a bacteriilor în natură	438
COLONIZAREA GENETICĂ	440
TRANSGENOZA	447
EVOLUȚIA GENOMULUI BACTERIAN	449
Modalități de creștere a genomului bacterian	450
Dobândirea de noi funcții prin modificarea genelor existente	455
DOGME INFIRMATE	
TRANSCRIEREA INVERSĂ ȘI DOGMA CENTRALĂ A BIOLOGIEI MOLECULARE	461
Mecanismul molecular al activității transcriptazei inverse	462
COLINEARITATEA GENEI ȘI A PRODUSULUI SĂU PROTEIC	465
GENELE „SUPRAPUSE”	467
GENELE CU STRUCTURĂ DISCONTINUĂ	475
Exprimarea genelor „divizate” în celula eucariotă	476
Mecanismul molecular al exciziei intronilor	478
Originea și semnificația evolutivă a intronilor	487
Semnificația evolutivă a prezenței genelor divizate la bacterii	489
Intronii ca elemente genetice transpozabile	491
Reasortarea exonilor	491
Descoperirea AIN cu activitate catalitică	495
REGLAREA GENETICĂ A ACTIVITĂȚILOR CELULARE	
ORGANIZAREA ACTIVITĂȚILOR CELULEI BACTERIENE. CONTROLUL ȘI INTEGRAREA FUNCȚIILOR CELULARE	499
Operonul	504
Controlul exprimării cistronilor din operonul <i>lac</i>	509
Inducția sintezei enzimelor	511
Mecanismul molecular al inducției enzimatice	513
Represia sintezei enzimelor	517
Mecanismul molecular al represiei enzimatice	519
Inhibiția activității enzimelor	521
Mecanismul molecular al inhibiției	523
Controlul coordonat al activității celulare	525
Conceptul de proteină alosterică	525
Reglarea căilor metabolice ramificate	529
Represia prin catabolit	533
Mecanismul molecular al represiei prin catabolit	535

Alte tipuri de organizare a operonilor bacterieni	542
Operonul triptofan. Fenomenul de „atenuare”	542
Operonul arabinoză. Inducția controlată de activator	544
Operonul <i>gal</i> . Prezența elementelor de reglare în unele gene structurale	547
Conceptul de reglare autogenă a exprimării genelor	548
Reglarea sintezei histidinei	549
Reglarea autogenă a operonului <i>hut</i>	550
Reglonul	552
Diversitatea mecanismelor de reglare la bacterii	554
Evoluția mecanismelor de reglare	555
Importanța reglării metabolice pentru biologia bacteriilor	556

INGINERIA GENELOR

IZOLAREA GENELOR <i>iac</i>	561
RESTRICȚIE ȘI MODIFICARE	563
Endonucleazele de restricție	567
Mecanismele moleculare ale modificării	577
Bazele genetice ale fenomenului de restricție și modificare	580
Importanța descoperirii sistemelor de restricție și modificare pentru biologia moleculară și aplicațiile sale	580
Semnificația biologică a sistemelor de restricție și modificare	584
BAZELE TEORETICE ȘI PRACTICE ALE INGINERIEI GENELOR	587
TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT	587
Conceptul de inginerie a genelor	588
Principii generale ale tehnicilor de inginerie a genelor	589
Obținerea fragmentelor de ADN utilizate pentru clonare	589
Vectorii de clonare	594
Clonarea moleculară și construcția moleculelor de ADN hibride	601
Condițiile exprimării genelor eucariote în celula bacteriană	605
Introducerea moleculelor de ADN himere în celula bacteriană	608
Selecția clonelor recombinante specifice	609
Aplicații practice și realizări ale tehnologiei ADN recombinant	611
Riscurile potențiale ale experiențelor de recombinare a ADN <i>in vitro</i>	621
Măsuri pentru prevenirea accidentelor produse de ADN recombinant <i>in vitro</i>	622
Perspectivile tehnologiei ADN recombinant	625
Bibliografie selectivă	627

101. The first of the two main groups of the ...
 102. ...
 103. ...
 104. ...
 105. ...
 106. ...
 107. ...
 108. ...
 109. ...
 110. ...
 111. ...
 112. ...
 113. ...
 114. ...
 115. ...
 116. ...
 117. ...
 118. ...
 119. ...
 120. ...

UNIVERSITY LIBRARY

121. ...
 122. ...
 123. ...
 124. ...
 125. ...
 126. ...
 127. ...
 128. ...
 129. ...
 130. ...
 131. ...
 132. ...
 133. ...
 134. ...
 135. ...
 136. ...
 137. ...
 138. ...
 139. ...
 140. ...
 141. ...
 142. ...
 143. ...
 144. ...
 145. ...
 146. ...
 147. ...
 148. ...
 149. ...
 150. ...
 151. ...
 152. ...
 153. ...
 154. ...
 155. ...
 156. ...
 157. ...
 158. ...
 159. ...
 160. ...
 161. ...
 162. ...
 163. ...
 164. ...
 165. ...
 166. ...
 167. ...
 168. ...
 169. ...
 170. ...
 171. ...
 172. ...
 173. ...
 174. ...
 175. ...
 176. ...
 177. ...
 178. ...
 179. ...
 180. ...
 181. ...
 182. ...
 183. ...
 184. ...
 185. ...
 186. ...
 187. ...
 188. ...
 189. ...
 190. ...
 191. ...
 192. ...
 193. ...
 194. ...
 195. ...
 196. ...
 197. ...
 198. ...
 199. ...
 200. ...

201. ...
 202. ...
 203. ...
 204. ...
 205. ...
 206. ...
 207. ...
 208. ...
 209. ...
 210. ...
 211. ...
 212. ...
 213. ...
 214. ...
 215. ...
 216. ...
 217. ...
 218. ...
 219. ...
 220. ...
 221. ...
 222. ...
 223. ...
 224. ...
 225. ...
 226. ...
 227. ...
 228. ...
 229. ...
 230. ...
 231. ...
 232. ...
 233. ...
 234. ...
 235. ...
 236. ...
 237. ...
 238. ...
 239. ...
 240. ...
 241. ...
 242. ...
 243. ...
 244. ...
 245. ...
 246. ...
 247. ...
 248. ...
 249. ...
 250. ...

Prefață

Volumul al treilea al „Tratatului de microbiologie generală” reunește unele probleme de bază ale geneticii moleculare prezentate din punctul de vedere al unui microbiolog. Lucrarea este structurată în șase secțiuni, care cuprind: 1) organizarea genetică a bacteriilor; 2) funcțiile materialului genetic; 3) variabilitatea și evoluția bacteriilor; 4) dogme infirmate; 5) reglarea genetică a activităților celulare la bacterii și 6) ingineria genelor.

În momentul elaborării lucrării, unele concepte și puncte de vedere referitoare la unele probleme, ca semnificația biologică și rolul în evoluție al mutațiilor, al plasmidelor și al elementelor genetice transpozabile, ca și al recombinărilor genetice, în general, pentru a le cita numai pe cele mai importante, erau controversate. Specialiștii în domeniile menționate au opinii divergente, atât între ei, cât și față de cele ale cercetătorilor care au încercat sinteze bazate pe concepții mai generale, integratoare. Ca urmare, am prezentat în fiecare capitol punctul de vedere al specialiștilor respectivi, încercând o reconciliere a datelor contradictorii, fie în capitole speciale (ca, de exemplu, „Stabilitate și variabilitate genetică în natură”), fie în subcapitole de sinteză, în care am urmărit o prezentare mai echilibrată a datelor. Unele diferențe privind valorile ce caracterizează fizic moleculele de ADN, ARN sau chiar unele gene (lungime, greutate moleculară, număr de nucleotide etc.), explicabile, pe de o parte, prin utilizarea unor tehnici cu limite de fidelitate diferite și, pe de altă, prin efectuarea lor de autori diferiți, în perioade diferite de timp, au fost prezentate ca atare, cu menționarea autorului și anului publicării lucrării.

Cercetările efectuate în special în ultimul deceniu au arătat, contrar celor afirmate de J. Monod, că „ceea ce este adevărat pentru colibacili” nu „este adevărat pentru elefant”. Multe dintre conceptele considerate ca imuabile și definitiv statornicite au fost profund remaniate. Descoperirea transcripției inverse și infirmarea dogmei centrale a biologiei moleculare, descoperirea genelor cu structură „discontinuu” sau „divizate”, a genelor „suprapuse”, precum și a abaterilor de la dogma colinearității și a „universalității” codului genetic au determinat tratarea acestor probleme într-o secțiune specială. Datorită unor condiții obiective, bibliografia este limitată la unele articole originale cu importanță fundamentală și la o serie de reviste generale, care conțin date suplimentare asupra problemelor tratate.

Lucrarea încearcă să propună echivalențe românești pentru o serie de termeni specifici din literatura de specialitate de limbă engleză, care au fost menționați ca atare în paranteze. În alegerea lor, am folosit, în primul rând,

semnificația acordată de cei care i-au propus pentru prima dată, ca și echivalențele din limba franceză.

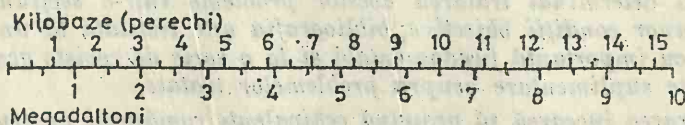
Prezentînd celor interesați cel de-al treilea volum al Tratatului de microbiologie generală, mă gîndesc cu recunoștință la numeroșii oameni de știință care mi-au oferit lucrările lor, permițîndu-mi o informare promptă și complexă, care stă la baza concepției și elaborării acestei lucrări. Cu aceleași sentimente, mulțumesc prietenului meu, dr. Mihai Zamfirescu, pentru tot ceea ce a făcut pentru mine, cu devotament, de-a lungul multor ani.

Mulțumesc cu recunoștință, prof. dr. Ion Anghel, referentul științific al lucrării, pentru bunele aprecieri, grija și competența științifică cu care a analizat manuscrisul și pentru discuțiile interesante purtate. De asemenea, mulțumesc în mod deosebit colegului meu, dr. Lucian Gavrilă, care a avut amabilitatea de a citi cu atenție manuscrisul lucrării, pentru sugestiile făcute și discuțiile totdeauna interesante și deosebit de competente. Sînt în mod deosebit îndatorat dr. Anca Roșcanu, pentru sprijinul constant acordat cu competență și seriozitate, sacrificînd multe ore din timpul său liber. Lucrarea a beneficiat și de data aceasta de talentul și inteligența graficianului Lucian Apetre, care a executat ilustrația grafică și prezentarea planșelor. Ca și în cazul volumelor precedente, mă simt profund îndatorat dr. Lucia Dumitru, care m-a ajutat pe parcursul întregii lucrări, cu competență, devotament și mult spirit de ordine, fără al cărei ajutor elaborarea acestui volum nu ar fi fost posibilă.

Următoarele volume vor prezenta probleme de imunobiologie (IV), biotehnologiile microbiene (V) și biologia microorganismelor eucariote și ecologia microorganismelor (VI).

Mulțumind tuturor colegilor pentru recenziile publicate și pentru aprecierile referitoare la primele două volume, exprim speranța că și volumul de față va fi util celor care lucrează în diferitele domenii ale științelor vieții sau celor care se vor consacra acestui studiu în viitor. Cu acest gînd, voi primi cu recunoștință orice observație directă, colegială, privind conținutul și structura acestui volum sau ale celor care îi vor urma.

AUTORUL



Scală de conversie a greutatei moleculare a ADN dublu catenar (exprimată în megadaltoni) la kilobaze perechi.

ORGANIZAREA GENETICĂ A BACTERIILOR

„Mesajul înscris în materialul genetic conține nu numai planurile arhitecturii celulare, ci și programul de coordonare a proceselor biosintetice, ca și al mijloacelor care asigură executarea lui”

F. JACOB

„Cromosomul codifică funcțiile esențiale necesare pentru viața de toate zilele a celulei bacteriene, în timp ce genele prezente întâmplător, ca, de exemplu, cele pentru rezistența la antibiotice, tind să fie localizate pe elementele genetice extracromosomale”.

R. D. DAVEY
D. C. REANNEY

Arhitectura moleculară a acizilor nucleici

(Pl. 1—5)

Deși descoperirea acizilor nucleici datează din anii 1868—1874 (Miescher) și unele date importante privind componentele lor structurale sînt foarte vechi, cele mai însemnate progrese au fost realizate în ultimele patru decenii, respectiv după ce s-a demonstrat, fără echivoc, rolul lor de suport chimic al eredității (Avery, 1944). A devenit evident că toate sistemele biologice conțin două tipuri de acizi nucleici, *acidul dezoxiribonucleic* (ADN) și *acidul ribonucleic* (ARN), stabilindu-se rolul și funcțiile lor în procesele de ereditate și variabilitate. Spre deosebire de organisme, virusurile conțin numai un singur tip de acid nucleic, fie ADN (*dezoxivirusuri*), fie ARN (*ribovirusuri*), iar virozii numai ARN.

Componentele structurale ale ADN

Cele două tipuri de acid nucleic sînt polimeri de nucleotide, respectiv molecule complexe, constituite din unirea unui număr mare de unități monomere, numite *nucleotide*. Fiecare nucleotid, reprezentînd unitatea structurală fundamentală a acizilor nucleici, este alcătuit din trei componente: 1) o bază purinică sau pirimidinică; 2) o moleculă de pentoză și 3) un rest de fosfat anorganic.

Bazele azotate. Fiecare tip de acid nucleic conține patru tipuri de nucleotide, care se deosebesc după natura bazelor ce intră în compoziția lor: *adenina* (A), *guanina* (G), *timina* (T) și *citozina* (C), în structura ADN, și respectiv *adenina*, *guanina*, *citozina* și *uracilul* (U), în structura ARN. Adenina (6-aminopurina) și guanina (2-amino-6-oxipurina) sînt baze purinice. Timina (5-metil-2,4-dioxipirimidina), citozina (2-oxi-4-aminopirimidină) și uracilul (2,4-dioxipirimidina) sînt baze pirimidinice.

În afara acestor baze azotate „obișnuite” sau „comune” în structura genomului ADN al fagilor din seria T-par au fost semnalate o serie de baze modificate, ca: 5-hidroximetilcitozină, 5-metilcitozină, 5-hidroximetiluracil, 2-aminoadenină, 5-hidroxipentiluracil, α -putrescîn-timină etc. (tabelul nr. 1). Ca excepții de la această regulă, Kornberg (1980) citează prezența timinei în ARNt și a uracilului în ADN la unii bacteriofagi și tranzitoriu în multe molecule de ADN. Tipul de structură descris conferă moleculelor de ADN două avantaje: 1) „coloana vertebrală” a moleculei,

Tabelul nr. 1

Constituenții acizilor nucleici și denumirile lor

Acidul nucleic	Bazele azotate	Pentozele	Nucleozidele	Nucleotidele
ADN	Purine		Dezoxiribonucleozide	Dezoxiribonucleotide
	Adenină (A)	Dezoxiriboză	Dezoxiadenozină	Acid dezoxiadenilic (dAMP)
	Guanină (G)	Dezoxiriboză	Dezoxiguanozină	Acid dezoxiguanilic (dGMP)
	Pirimidine			
	Citozină (C)	Dezoxiriboză	Dezoxicitidină	Acid dezoxicitidilic (dCMP)
	Timină (T)	Dezoxiriboză	Dezoxitimidină	Acid dezoxitimidilic (dTMP)
ARN	Purine		Ribonucleozide	Ribonucleotide
	Adenină	Riboză	Adenozină	Acid adenilic (AMP)
	Guanină	Riboză	Guanozină	Acid guanilic (GMP)
	Pirimidine			
	Citozină	Riboză	Citidină	Acid citidilic (CMP)
	Uracil	Riboză	Uridină	Acid uridilic (UMP)

bazată pe structura 2-dezoxi, este mult mai rezistentă la hidroliză decât forma ribo și 2) timina conferă o stabilitate mai mare mesajului genetic.

Pentozele sînt reprezentate de *dezoxiriboză* (β -D-2-dezoxiribofuranoză), în structura ADN, și *riboză* (β -D-ribofuranoză), în structura ARN. Combinarea unei baze azotate cu o moleculă de pentoză formează un nucleozid. După cum este evident, denumirile celor doi acizi nucleici reflectă natura pentozei prezente în structura lor.

Acidul fosforic, sub formă de ortofosfat, conferă moleculei caracterul acid și numeroase sarcini negative. Datorită lor, acizii nucleici sînt molecule puternic ionizate. In vivo, sarcinile negative sînt neutralizate, fie prin intermediul histonelor, la eucariote, sau al proteinelor similare histonelor („histone-like”), la bacterii, fie de acțiunea cationilor anorganici (în special Mg^{2+}). În cazul virusurilor, acțiunea neutralizantă este efectuată de poliamine.

Din cele prezentate rezultă două deosebiri între ADN și ARN, dintre care una, considerată efectiv majoră, este reprezentată de prezența ribozei în ARN și a dezoxiribozei în ADN. Cea de-a doua deosebire constă în prezența uracilului în moleculele de ARN în locul timinei (5-metil-uracil).

Structura primară a ADN

Structura primară a ADN rezultă din succesiunea specifică a celor patru mononucleotide principale, dAMP, dGMP, dTMP și dCMP, care stabilesc între ele legături covalente $3' \rightarrow 5'$ fosfodiester. Aceste legături

se realizează între o grupare OH în poziția 3' din molecula de dezoxiriboză (în cazul ADN) sau de riboză (pentru ARN) și gruparea —OH situată în poziția 5' a dezoxiribozei sau ribozei din mononucleotidul adiacent. Datorită legăturii fosfodiester, nucleotidele pot forma lungi catene polinucleotidice, neramificate, în care succesiunea specifică a celor patru baze (A, T, C, G) asigură codificarea informației genetice. Structura primară corespunde deci unei configurații monocatenare lineare cu o extremitate 3'OH liberă și alta 5', în general fosforilată. Această particularitate implică existența unei *polarități* a catenei polinucleotidice. Prezența legăturilor fosfodiester internucleotidice conferă catenei un grad important de flexibilitate care permite realizarea structurilor secundare și terțiare ale moleculelor, cu semnificație funcțională deosebită.

Structura secundară a ADN. Modelul Watson—Crick

Structura secundară a moleculei de ADN rezultă din asamblarea coaxială a două helice polinucleotidice orientate spre dreapta. Elaborarea modelului de structură dublu helicală de către Watson și Crick (1953) este considerat ca unul dintre cele mai importante evenimente care au stat la baza revoluției biologiei moleculare, deoarece a permis înțelegerea mecanismelor esențiale care asigură transmiterea corectă a informației genetice. În elaborarea acestui model, ei au utilizat datele lui Wilkins și Rosalind Franklin (1951, 1952), referitoare la analiza structurală a ADN cu ajutorul difracției în raze X, care sugerau existența unor structuri para cristaline, cu dimensiuni repetate la intervale precis determinate. Fapt remarcabil, imaginile obținute cu diferite tipuri de ADN erau foarte asemănătoare, indiferent de proveniența lor, ceea ce proba existența unui model molecular unic.

Cîteva date experimentale anterioare au contribuit evident la elaborarea acestui model. Între cele mai semnificative, sînt de menționat următoarele: 1) numărul bazelor purinice (A + G) este egal cu cel al bazelor pirimidinice (C + T); 2) suma bazelor azotate adenină și citozină este egală cu suma bazelor guanină și timină: (A + C) = (G + T); 3) raportul $\frac{A}{T}$, ca și raportul $\frac{G}{C}$ sînt egale cu 1; raportul $\frac{A + G}{T + C} = 1$.

Utilizînd corect toate datele și observațiile preliminare, Watson și Crick au elaborat modelul de structură dublu helicală al moleculei de ADN, care are la bază două caracteristici fundamentale:

1) **Principiul complementarității.** În conformitate cu acest principiu nu există nici o restricție în ceea ce privește succesiunea bazelor de-a lungul uneia dintre catene, dar secvența bazelor într-una din catene *specifică*, adică *determină* cu o necesitate absolută secvența bazelor în catena opusă, în așa fel încît cele două catene au în mod obligatoriu *secvențe complementare*. La nivel molecular, fenomenul de complementaritate este determinat de faptul că cele două catene polinucleotidice sînt menținute împreună prin legături de hidrogen, care se stabilesc între bazele situate pe cele două

catene numai sub forma unor perechi riguros specifice. În acest sens, singurele combinații permise de structura ADN sînt limitate la perechile de baze A—T (sau T—A) și G—C (sau C—G) care au aceeași formă și mărime. Datorită constrîngerilor stereochemice, o bază purinică de pe o catenă trebuie să aibă în mod obligatoriu o bază pirimidinică pe catena opusă. Aceasta confirmă și explică observația empirică a lui Chargaff (1950, 1951), care arătase că raportul A/T, ca și cel G/C sînt egale cu 1. Adenina și timina se pot împerechea spațial prin stabilirea a două legături de H, iar citozina și guanina prin trei legături de H (fig. 1). Datorită aces-

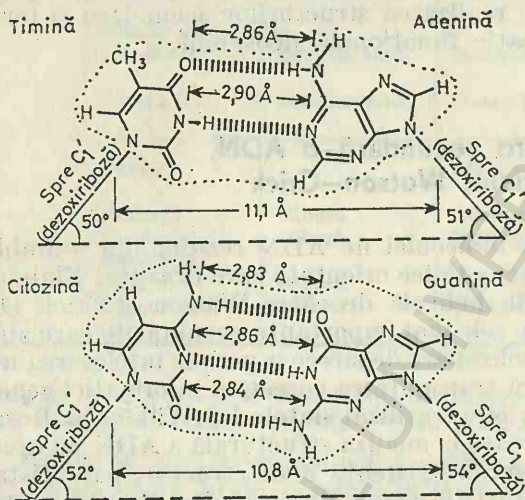


Fig. 1. — Formarea perechilor de baze prin legături de hidrogen. Distanțele interatomice și unghiurile sînt aproximativ aceleași pentru perechile de baze A—T și G—C (după Kornberg, 1980).

tui fapt, legăturile G—C sînt mult mai stabile, ceea ce influențează proprietățile fizice, chimice și biologice ale moleculei. Alte modalități de legare nu sînt posibile, datorită constrîngerilor dimensionale și de geometrie moleculară. Împerecherea A—G este nepermisă, deoarece are o dimensiune prea mare, în raport cu spațiul intern dintre cele două catene care are un diametru de 2,0 nm. Perechea C—T nu poate forma legături stabile de H, deoarece datorită dimensiunii lor, cele două baze situate pe catene opuse sînt prea îndepărtate. În cazul perechilor normale A—T și C—G, atît distanțele interatomice, cît și unghiurile de înclinare ale bazelor sînt aproximativ aceleași. Pauling și Corey (1956) au arătat că, deși perechile G—C sînt puțin mai apropiate, mai compacte și mai dense decît A—T, aceste particularități nu influențează geometria de ansamblu a moleculei.

Semnificația complementarității bazelor. Conceptul complementarității bazelor reprezintă particularitatea cea mai importantă a moleculei cu structură dublu helicală de ADN (Watson și Crick, 1953). El explică mecanismul de replicare corectă a ADN, cît și capacitatea de transmitere a informației. Complementaritatea explică atît mecanismul transcrierii, cît și pe cel al traducerii informației genetice. Ea stă la baza unor procese fundamentale cum sînt cele de recombinare genetică și de reparare a leziunilor ADN.

2) A doua caracteristică fundamentală a modelului Watson—Crick decurge din faptul că legăturile fosfodiester $3' \rightarrow 5'$ sînt orientate în cele două catene cu polaritate opusă. Cele două catene „merg” în direcții opuse, adică sînt antiparalele (\rightleftharpoons) una față de cealaltă. Această particularitate este evidențiată în fig. 2, în care moleculele de pentoză au aceeași orientare într-o catenă, dar sînt situate în poziții inverse în cele două catene complementare. Orientarea relativă sau direcția unei catene este reprezentată schematic printr-o săgeată îndreptată cu vîrfurile spre extremitatea $3'$ și baza la extremitatea $5'$. Orientarea antiparalelă a celor două catene din molecula de ADN explică mecanismul replicării ADN a cărui sinteză începe de la extremitatea liberă $5'$ spre extremitatea liberă $3'$, determinînd, după cum se spune, o „creștere” în direcția $5' \rightarrow 3'$.

Pe baza acestor concepte și detalii de structură chimică, moleculele de ADN dublu helicale au, în conformitate cu modelul Watson—Crick, următoarele particularități, ilustrate în vedere laterală în fig. 3.

„Coloana vertebrală” „scheletul” („backbone”) moleculei este alcătuit din două catene polinucleotidice, care formează o dublă helice dirijată spre dreapta („right-handed”) sau dextrorsă, în jurul unui ax comun imaginar al moleculei. Cele două catene, denumite colocvial catena Watson, iar cea complementară, catena Crick, sînt răsucite una față de cealaltă după un model plectonemic (adică împletite și nu separabile) pentru a forma o dublă helice regulată cu diametrul de 2,0 nm, care prezintă o incizură (adîncitură) mare sau profundă („major groove” sau „deep groove”) avînd 2,2 nm și o incizură mică sau superficială („minor groove” sau „shallow groove”), de 1,2 nm. Cele două catene antiparalele (una cu direcția $5' \rightarrow 3'$ orientată în sus, iar cealaltă în sens invers) sînt alcătuite din molecule de dezoxiriboză legate cu grupări fosfat prin legături fosfodiester $3' \rightarrow 5'$. Bazele azotate de pe cele două catene sînt legate între ele prin legături de H și de moleculele de dezoxiriboză prin legături β -N-glicozil. Ele sînt molecule plane și sînt reprezentate în figură sub forma unor linii orizontale continue, care ocupă regiunea centrală a helicei. Această regiune este indicată în diagramele din dreapta helicei care prezintă două secțiuni transversale la nivelul bazelor A—T și G—C sub forma unui dreptunghi delimitat de o linie întreruptă.

Planul suprafeței bazelor este perpendicular pe axul vertical și separat de fiecare din bazele vecine cu o distanță verticală de 0,34 nm. Molecula de ADN d.h. are 10 pb per tură completă (360°) de helice. Pașul helicei are o lungime verticală de 3,4 nm. Fiecare pereche de baze este rotită cu 36° în raport cu moleculele adiacente. De aceea, în reprezentare grafică perechile de baze succesive apar sub forma unor linii cu lungimi diferite, în funcție de unghiul sub care sînt observate (Gelln și Gear, 1980; Birge, 1981).

Se consideră că cel puțin trei categorii de forțe stabilizează molecula de ADN d.h. (Gros și Grunberg-Manago, 1974):

1) Legăturile de H ce asigură împerecherea bazelor, care, deși sînt slabe, contribuie la stabilizarea moleculei datorită numărului lor mare. Se apreciază că energia necesară pentru a rupe o legătură de H este de $\sim 5,6$ cal/mol.

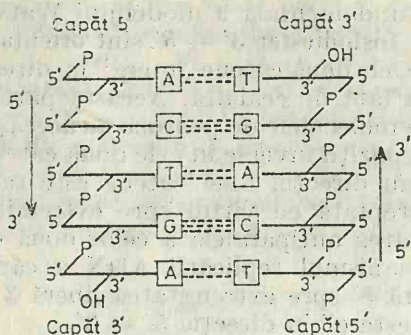


Fig. 2. — Schema unui segment de ADN dublu catenar, evidențiind orientarea antiparalelă a catenelor complementare.

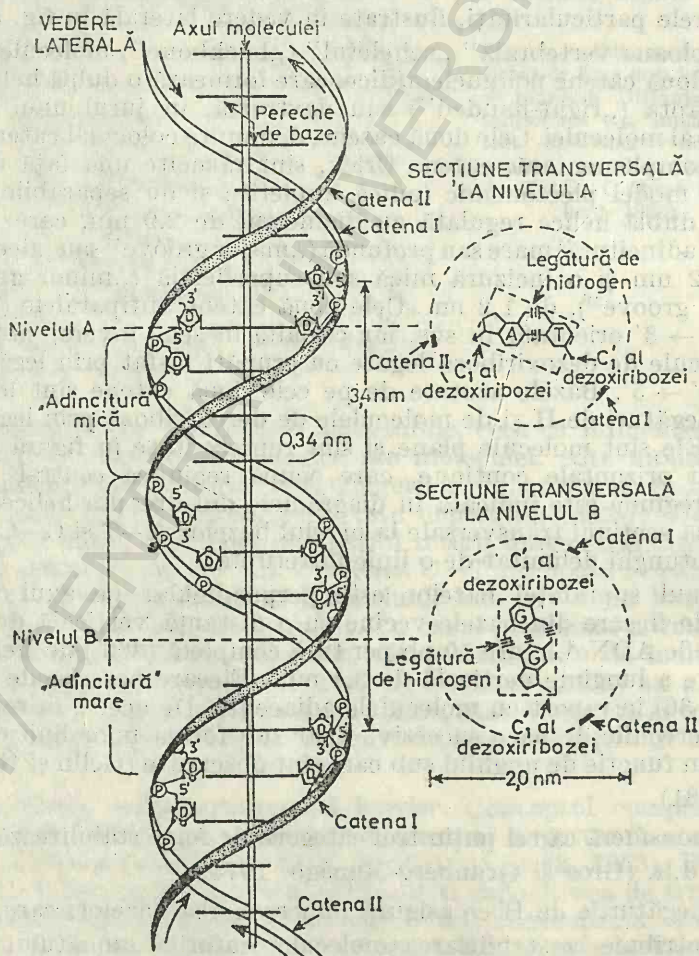


Fig. 3. — Structura detaliată a moleculei de ADN dublu catenar (după Birge, 1981).

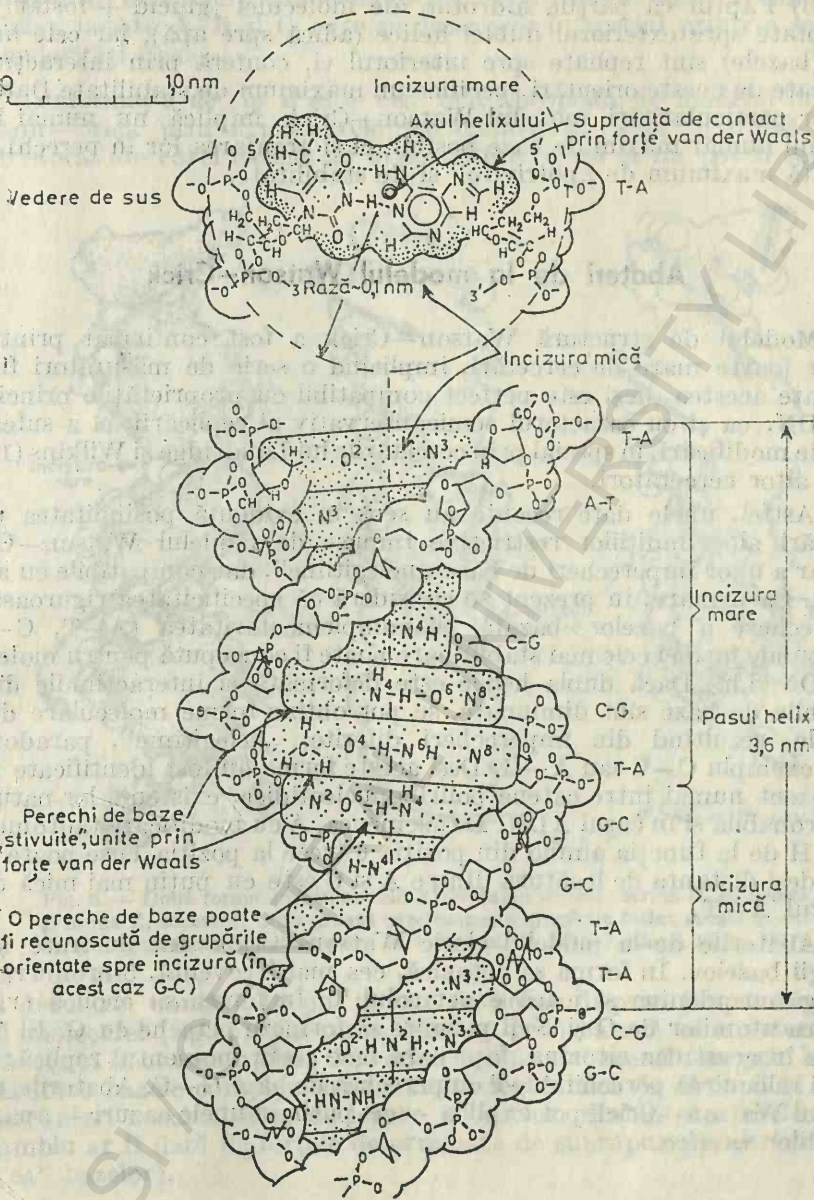


Fig. 4. — Arhitectura moleculară detaliată a unui segment dintr-o moleculă de ADN de tip B, evidențiind „stivuirea” bazelor componente (după Arnott și Huggins, 1975).

2) Interacțiunile electronice, respectiv legăturile van der Waals și atracțiile dipol—dipol dintre planurile bazelor suprapuse sau „stivuite” („stacked”) care prezintă suprafețe speciale de contact (fig. 4).

3) Faptul că părțile hidrofiele ale moleculei (glucid + fosfat) sînt îndreptate spre exteriorul dublei helice (adică spre apă), iar cele hidrofobe (bazele) sînt repliate spre interiorul ei, conferă prin interacțiunile implicate de aceste orientări specifice un maximum de stabilitate. Datorită acestor particularități, modelul Watson—Crick implică nu numai legarea unui număr maxim de baze posibil, ci și aranjarea lor în perechi care prezintă maximum de „potrivire” și de stabilitate.

Abateri de la modelul Watson—Crick

Modelul de structură Watson—Crick a fost confirmat printr-un număr foarte mare de cercetări, implicînd o serie de măsurători fizice. Cu toate acestea, deși este perfect compatibil cu proprietățile principale ale ADN, ca și cu caracterul semiconservativ al replicării, el a suferit o serie de modificări, în special prin cercetările lui Landridge și Wilkins (1960) și ale altor cercetători.

Astfel, unele date recente au scos în evidență posibilitatea unor nuanțări ale condițiilor restrictive impuse de modelul Watson—Crick și chiar a unor împerecheri de baze „nelegitime”, dar compatibile cu acest model. Ca urmare, în prezent se consideră că specificitatea riguroasă de împerechere a bazelor, bazată pe complementaritatea (A—T, C—G), corespunde formei cele mai stabile care poate fi concepută pentru molecula de ADN d.h. Dacă dubla helice este deformată și interacțiunile dintre perechile de baze sînt diminuate, se pot obține forme moleculare dublu helicale, rezultînd din împerecheri diferite, „nelegitime”, paradoxale, ca de exemplu C—C sau A—G. Deși aceste forme au fost identificate pînă în prezent numai între catene poliribonucleotidice, existența lor naturală este probabilă și în cazul ADN. De asemenea, A cu modificare tautomerică (cînd H de la funcția amino din poziția 6 trece la poziția 1) se poate lega cu C, deși distanța de legătură dintre A și C este cu puțin mai mică decît în cazul A—T.

Abaterile de la modelul clasic Watson—Crick sînt ilustrate și de analogii bazelor. În forma sa cetonică, cea mai frecventă, 5-bromuracilul se leagă cu adenina și joacă exact rolul T. În forma sa enolică (rară), așezarea atomilor de O și N îi permite să formeze pereche cu G. El înlocuiește în acest caz citozina, fapt care face ca în momentul replicării să inducă înlocuirea perechii A—T cu perechea de baze G—C. Abaterile de la modelul Watson—Crick pot explica — cel puțin în unele cazuri — apariția mutațiilor *in vivo*.

Conformațiile moleculelor de ADN dublu helical

După elaborarea modelului Watson—Crick de structură a ADN d.h., o serie de cercetători (Wilkins, 1960; Landridge și colab., 1960; 1961; Marvin, 1965 etc.) au demonstrat, într-o primă fază, cu ajutorul difracției în raze X, posibilitatea existenței acestuia în trei tipuri conformaționale

numite forme canonice („canonical forms” sau forme standard recunoscute, valabile), notate A, B și C, care se deosebesc în special printr-o serie de particularități fizice.

Conformația de tip B este cea mai apropiată de modelul original Watson—Crick prin următoarele particularități. Este o dublă helice de dreapta, ale cărei catene au o polaritate opusă și nu pot fi separate

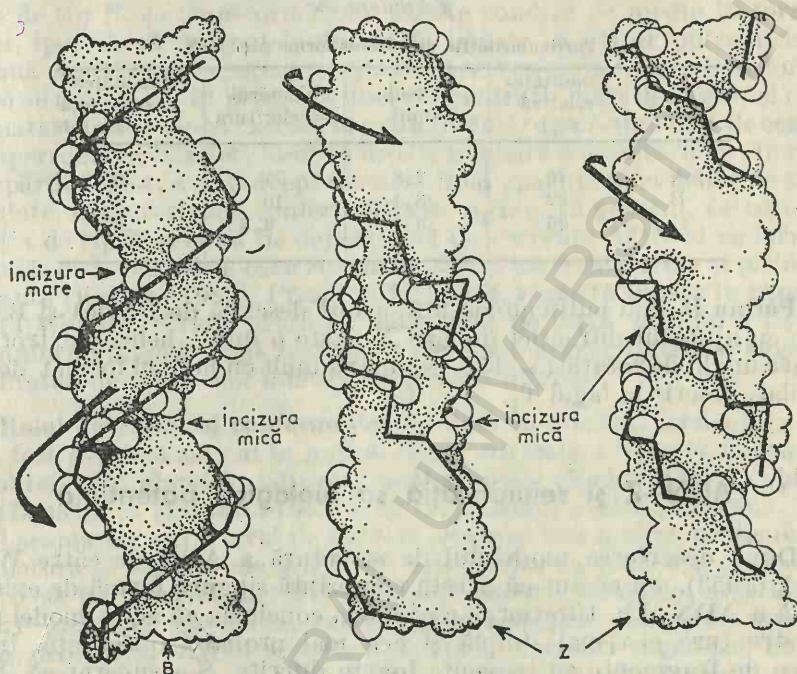


Fig. 5. — Două forme moleculare ale ADN dublu helical: forma B, dextrorsă, și forma Z, senestră. Linia groasă care reunește grupările fosfat scoate în evidență aspectul neregulat senestru al helixului de ADN-Z (după Rich, 1980).

fără derulare. Conține 10 pb. pe tur de helice dispuse perpendicular pe axul moleculei (fig. 5). Secvența bazelor pe o catenă este determinată de secvența în catena opusă. Cele două catene sînt menținute prin legături de H între bazele complementare. Rolul legăturilor de H ar fi în special de a conferi specificitatea de legare a bazelor. Stabilitatea moleculei în ansamblu ar fi dată de forțele determinate de suprapunerea strînsă („stivuirea” bazelor).

Conformația de tip A corespunde, de asemenea, unei duble helice de dreapta. Spre deosebire de forma B, la care bazele au o poziție orizontală, în această conformație ele apar înclinate într-un unghi de 20° față de perpendiculara axului. Această configurație determină modificări în „pasul” helicei (2,8 nm în loc de 3,4 nm), în numărul de baze pe tur de helice (11) etc. Tranziția de la B la A s-ar realiza *in vivo* sub acțiunea unor proteine, iar *in vitro*, în prezența solvenților organici.

Conformația de tip C este tot o dublă helice de dreapta (dextrorsă) în care forțele de „stivuire” a bazelor ar fi mult diminuate. O ușoară înclinare a bazelor antrenează mici diferențe în pasul helicei, în numărul bazelor pe tur de helice și în conformația „coloanei” în raport cu tipul B (tabelul nr. 2). Această conformație, observată *in vitro* la concentrații ionice mari, este importantă deoarece ar fi întâlnită în unele genomuri virale.

Tabelul nr. 2

Particularitățile diferitelor forme ale ADN

Forma	Umiditatea relativă (%)	Pasul (nm)	Numărul bazelor/tură	Inclinarea bazelor față de orizontală
A	75	2,8	71	20°
B	92	3,4	10	0°
C	66	3,1	9,3	6°

Forma D, mai puțin cunoscută, a fost descrisă de Davies și Baldwin (1963) cu ajutorul difracției în raze X. Este o dublă helice dextrorsă, cu un mare unghi de rotație ($\sim 45^\circ$). Seamănă mult cu helixul format de ADN glicozilat, descris la fagul T₂.

ADN-Z și semnificația sa biologică potențială

După descrierea modelului de structură a ADN de către Watson și Crick (1953), s-a crezut că acesta reprezintă singura formă de existență posibilă a ADN d.h. Ulterior, s-a ajuns la concluzia că acest model reprezintă structura cea mai simplă și cea mai probabil observată, într-un amestec de fragmente cu secvențe foarte diferite. S-a sugerat că, fără a anula regula complementarității de legare a bazelor (A—T, C—G), există și alte posibilități de aranjare spațială a celor două catene de ADN. Pohl (1967) a sugerat că unele molecule de ADN, în care bazele G și C ar fi legate la întîmplare, ar putea lua configurația de helice orientată spre stînga.

Lucrînd cu minimolecule de ADN d.h. sintetice în stare cristalină alcătuit din două baze în secvență alternantă (CGCG, respectiv CGCGCG), Rich (1980), precum și Itakura (1980) au demonstrat posibilitatea obținerii unor molecule de ADN d.h., care se abat de la modelul clasic descris de Watson și Crick. Utilizîndu-se o tehnică de difracție în raze X de mare rezoluție (0,09 nm, corespunzînd după Rich unei rezoluții atomice), s-a evidențiat existența unor molecule dublu helicale „de stînga”, cu 12 baze pe fiecare tură, în care, deși perechile de baze sînt de tip normal, „seara” helicală este rotată altfel decît în modelul clasic. Ca urmare, molecula își pierde simetria caracteristică modelului Watson—Crick, deoarece „scheletul” fosforilat nu se mai aliniază pentru a forma o helice continuă dextrorsă, ci ia o formă neregulată. Rich (1980) a propus denumirea de ADN—Z pe de o parte, pentru a caracteriza aspectul său în zigzag și, pe de alta,

pentru a scoate în evidență (litera Z fiind situată la celălalt capăt al alfabetului) deosebiri mari față de formele A, B, C și D descrise anterior.

Deși consideră că cea mai mare parte din ADN celular are conformația B, de dreapta, Rich nu exclude posibilitatea ca măcar o parte din el să ia o conformație senestră.

De altfel, Arnott și colab. (1980) au arătat că ADN sintetic prezent sub forma unor catene lungi, cu succesiunea de baze CG și configurația clasică de tip B, se transformă în anumite condiții de mediu în forma Z. De aici, ipoteza că secvențele de ADN bogate în CG ar putea exista în cele două configurații spațiale posibile. Trecerea de la forma B la forma Z *in vitro* se realizează în prezența unei concentrații mari de $MgCl_2$ și constă din separarea celor două catene, urmată de rulara lor, una față de cealaltă, și reîmperecherea bazelor, însoțită de o schimbare a orientării lor, în raport cu grupările fosfat, avind drept rezultat final apariția unei helice de stînga, neregulate; caracteristică conformației în zigzag. În general, *in vitro*, conformația de tip Z pare să fie dependentă de secvența ADN și se formează de regulă, de la secvențe care conțin cantități mari de purine și pirimidine alternante (Kolata, 1983). Prezența formei Z, răsucită invers în raport cu modelul Watson—Crick, arată că moleculele de ADN d.h. au o flexibilitate conformațională mult mai mare decât s-a crezut inițial și sugerează posibilitatea de a lua mai multe configurații diferite.

Rolul potențial al conformației Z. Pînă în prezent, forma Z a ADN d.h. a fost descrisă numai în puține celule normale, respectiv în cromosomii politeni din glandele salivare, la *Drosophila* (Rich, 1981), la chironomide (Lemeunier și colab., 1982) și în cromosomii umani (Hamada, 1982). Ținînd seama de caracterul de universalitate al mai multor particularități de structură și funcție ale ADN, nu este exclus ca prezența acestei conformații să fie descrisă în viitor și la alte sisteme biologice, ca și la unele virusuri, animale. De aceea, semnificația biologică potențială merită o atenție deosebită, mai ales pentru că unele cercetări sugerează că tranziția $B \rightarrow Z$ poate avea loc în condiții compatibile cu un mediu normal, fiziologic. Astfel, fixarea unei grupări metil la citozină reduce de $\sim 1\,000$ de ori cantitatea de Mg^{2+} necesară pentru tranziția $B \rightarrow Z$, iar adăugarea unei baze organice — spermina — o reduce de încă 300 de ori (Boho și Felsenfeld, 1981).

Analiza fină structurală a diferitelor fragmente de ADN, cu mijloace de înaltă rezoluție (de ordinul fracțiunilor de angstrom), a arătat că în conformația modificată Z sînt expuse părți diferite ale moleculei de ADN, care sînt „ascunse” în forma normală, dextrorsă. Acest fenomen este însoțit de modificări în structura locală a ADN (în pasul helicei, înclinarea bazelor azotate în raport cu axul helicei etc.), corelate cu ordinea de succesiune a bazelor. Aceasta sugerează că diferențele care reflectă secvența bazelor și/sau modificările de conformație ale moleculei de ADN pot fi recunoscute de la exterior de oricare altă moleculă cu care poate interacționa și în special de sisteme enzimactice complexe implicate în expresia genelor. În felul acesta, modificările conformaționale ar putea juca un rol important în procesele de reglare a activității celulare și, în primul rînd, în controlul exprimării genelor. Datele experimentale, deși puțin numeroase, sugerează anumite modalități de acțiune.

Ehrlich și Wang (1981) au arătat că metilarea citozinei are drept consecință stoparea exprimării unei gene date. Or, dacă metilarea *in vivo* a citozinei poate determina tranziția $B \rightarrow Z$ a ADN, respectiv a unui segment bogat în GC, este posibil ca „inactivarea” unei gene prin metilare să fie mai degrabă consecința schimbării conformației ADN, decât a modificării chimice. În acest fel, modificările $B \rightleftharpoons Z$ ar putea acționa ca un adevărat comutator pentru activitatea genelor. După Rich (1982), unele proteine, pe lângă faptul că se leagă specific numai de forma Z, pot produce și menține tranziția $B \rightarrow Z$. Ele se găsesc în cantități mici la *E. coli*, sînt prezente în cantități mai mari la *Drosophila*, în celulele tumorale umane și în cantități foarte mari în celulele grîului germinat. Proteinele de legare pentru ADN-Z (g.m. 70 000—150 000 dal) pot ajuta activitatea de reglare a genelor, probabil la nivelul transcrierii genetice. Un argument în acest sens este furnizat de Nordheim și Rich (1982), care au demonstrat că la virusul SV40, ADN-Z se formează numai în regiunea de reglare a ADN viral și în mod specific într-un segment în care transcrierea genetică este intensificată („transcriptional enhancer segment”), care conține o secvență bogată în baze purinice și pirimidinice, situate alternativ*. Aceste secvențe declanșează transcrierea, mărind de ~ 100 de ori transcrierea genelor adiacente. Ele ar corespunde situsului „de intrare” a ARN-poli-merazei, care odată legată de ADN ar suferi o difuziune unidimensională. Acest mecanism reprezintă, după Rich, o modalitate de a mări accesul la promotor, deoarece ADN se comportă ca o șină de cale ferată, de-a lungul căreia alunecă ARN-polimeraza. Această concepție este confirmată și de alte cercetări ale lui Rich și Nordheim (1983), care au găsit segmente cu secvențe alcătuite din purine și pirimidine în toate regiunile de reglare ale genomurilor virale studiate, ceea ce sugerează că formarea ADN-Z ar putea avea un rol potențial în activarea genelor. Această ipoteză este plauzibilă deoarece Quadrifoglio și colab. (1982) au demonstrat că anumite segmente scurte de ADN, bogate în GC, pot suferi tranziția $B \rightarrow Z$, în timp ce secvențele care le înconjură rămîn în conformația „normală” de tip B. În felul acesta, regiunile Z ale moleculelor de ADN ar putea deveni ținta posibilă a proteinelor de reglare celulară, a căror activitate este condiționată de „recunoașterea” foarte specifică a anumitor regiuni ale ADN celular. Deși în prezent se admite că ele recunosc anumite secvențe specifice scurte, normale, este posibil că în realitate acestea sînt fie anumite structuri modificate spațial (regiunile Z), fie anumite baze care devin mai accesibile prin tranziție.

Felsenfeld (1982) a arătat că regiunile Z fixează intens histonele, care determină prin natura lor represia nespecifică a segmentelor respective, în timp ce tranziția la conformația B este însoțită de trecerea genelor respective în stare activă. În felul acesta există posibilitatea ca „un viraj la stînga” al ADN, după expresia lui Hélène (1984), la începutul unei gene, să determine stoparea activității genei corespunzătoare, exercitînd astfel un control foarte eficient.

După Dickerson (1982), tranziția conformațională a ADN de la forma B la forma Z ar putea fi la originea activității anumitor substanțe. Ea ar

* Genomul SV₄₀ conține puține secvențe de acest gen în restul moleculei.

putea determina apariția unor situsuri de legare pentru anumite substanțe mutagene și/sau cancerigene. Date preliminare atestă că mutațiile apar cu frecvență mai mare la nivelul secvențelor ce iau conformația Z, care ar putea furniza baza moleculară a mutagenezei cu frecvență ridicată. Deși foarte recente și puțin numeroase, datele referitoare la ADN-Z demonstrează că moleculele de ADN dublu helical nu sînt structuri fixe, încremenite, ci, din contră, sînt sediul unor mișcări neîncetate (Hélène, 1984). Mișcările cele mai rapide, care determină modificări la nivelul anumitor legături ale „osaturii” fiecărei catene sînt foarte rapide (se realizează în intervale de timp de ordinul unei picosecunde, care reprezintă o milionime dintr-o milionime de secundă). Cele mai lente se petrec la nivelul legăturilor dintre perechile de baze, care se deschid și se închid în intervale cuprinse între 1/1000 secundă și o oră, în funcție de structura locală a ADN. După o expresie folosită curent, molecula de ADN „respiră”, sau, „pulsează”. Esențial este, după Hélène (1984), că pentru „o moleculă care se apropie de ADN, în căutarea unui situs de fixare, dubla helice nu apare ca o suprafață netedă și inertă, ci ca avînd multe „asperități” și „deformîndu-se neîncetat”.

Proprietățile fizico-chimice ale ADN și tehnicile de determinare ale acestora

Dimensiunile ADN. Sub raportul masei moleculare și al lungimii lor, moleculele de ADN sînt cele mai mari, descrise într-un sistem biologic (tabelul nr. 3). Dimensiunile reale ale moleculelor de ADN sînt greu de apreciat din două cauze :

1) Datorită formei lor, de molecule lungi, filiforme, neramificate, sînt foarte sensibile față de acțiunea stresului hidrodinamic, care determină ruperea lor în cursul izolării. Inițial, cînd acest efect nu era cunoscut, mărimea maximă a moleculelor de ADN izolate era apreciată în jur de 15 000 pb (~ 10 Mdal);

2) Asocierea nucleazelor contaminante determină o clivare a moleculelor în cursul izolării.

Datorită acestor dificultăți, se recomandă ca aprecierea masei moleculare și a lungimii moleculelor de ADN să se facă prin asocierea a cel puțin două—trei metode, datele cele mai apropiate de mărimea naturală obținîndu-se de la preparatele nepurificate și cu tehnici care implică manipulări minime.

Microscopia electronică. Utilizată inițial de Kleinschmidt și Zahn (1959), s-a dovedit o metodă extrem de utilă pentru studiul organizării structurale și funcționale a materialului genetic. Ea furnizează date privind mărimea și structura moleculelor de ADN, deosebirea regiunilor mono- de cele dublu catenare, forma lineară sau circulară, prezența formelor replicative, detectarea indirectă a complementarității între două molecule de ADN diferite, prin tehnica hibridării, prezența structurilor secundare în moleculele monocatenare, evidențierea complexelor de transcriere genetică, a interacțiunilor dintre ADN și proteine, cartarea genetică și

Tabelul nr. 3

Dimensiunile unor molecule de ADN și genomuri (modificat după Kornberg, 1980)

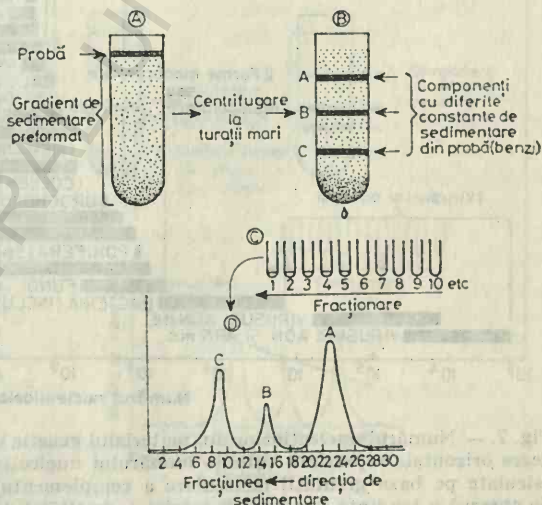
Virusul sau organismul	Mărimea genomului		Forma
	Numărul perechilor de baze (mii) (kilobaze)	Lungimea totală în μm (1 kb=0,34 μm)	
Polioma; SV40	5,10	1,73	Circulară Monocatenară circulară; formă replicativă dublu catenară
Fagul ΦX174	5,39	1,83	
Fagul M13 (fd, f1)	6,41	2,17	
Fagul P 4	10,70	3,63	Lineară
Fagul T 7	40,00	13,60	
Fagul P 22	43,20	14,68	
Fagul λ	48,60	16,52	
Fagii T-par	166,00	56,44	
Vaccina	190,00	64,60	
Avipox	280,00	95,20	
PROCARIOTE			
Mycoplasma hominis	760	258,40	Circulară
Escherichia coli	4 000	1 360,00	
EUCARIOTE			
Saccharomyces cerevisiae	13 500	4 590	17
Drosophila	165 000	56 100	4
Om	2 900 000	986 000	23
Lepidosiren paradoxa (pește diploid din America de Sud)	102 000 000	34 680 000	19

chiar aprecieri asupra greutateii moleculare și compoziției în baze. În această tehnică, moleculele de ADN extrase din celule cu ajutorul unor procedee blinde sînt depuse pe suprafața unui film monomolecular al unei proteine bazice (citocrom c), care plutește pe suprafața apei. Moleculele bazice care se adsorb pe grupările acide fosfat ale ADN măresc grosimea și implicit vizibilitatea ADN pe microelectronografii. Deoarece gradul de extindere fizică al ADN în cursul prelucrării nu poate fi controlat în mod reproductibil, determinările de lungime se exprimă ca valori medii \pm deviația standard, în raport cu molecule de ADN standard, cu masă moleculară cunoscută și niciodată ca lungime absolută (Brack, 1981). În general, se folosesc ca molecule standard de referință, ADN SV40 (5 226 pb), ΦX174 (5 386 nucleotide), fagul fd (6 408 nucleotide), plasmida pBR322 (4 361 pb). Unitatea de lungime utilizată cel mai frecvent este Kb (kilobaza). Ea poate fi utilizată pentru ADN d.e., la care înseamnă 1 000 de perechi de baze, sau pentru ADN și ARN monocatenar, la care reprezintă 1 000 de nucleotide sau de baze.

Radioautografia permite evidențierea moleculelor de ADN, care au încorporat timidină tritiată. După extracția din celule, aceste molecule sînt depuse pe filtre de membrană, sau pe suprafețe de sticlă, acoperite cu emulsie fotografică și menținute cîteva săptămîni sau luni la întuneric. În acest timp, radiațiile din atomii de tritiu care se dezintegrează, determină formarea de granulații de Ag de-a lungul moleculei de ADN. După dezvoltare și fixare, tehnica permite evidențierea formei moleculei de ADN, precum și aprecieri asupra lungimii și greutății moleculare. În condițiile menționate, o pereche de nucleotide măsoară 0,34 nm, de-a lungul axului moleculei.

Coefficientul de sedimentare al ADN este un parametru complex a cărui valoare depinde de masa moleculară, densitatea și forma moleculei. El se determină urmărindu-i viteza de sedimentare într-un câmp centrifugal, în apă, la 20°C, sau prin centrifugare zonală (fig. 6) într-un gradient de densitate (zaharoză sau CsCl). Valorile sînt exprimate de regulă în unități S (Svedberg), după multiplicare cu 10^{13} . Constantele de sedimentare (S) ale acizilor nucleici sînt corelate prin relații empirice, care diferă între moleculele mono- și dublu catenare cu masa moleculară a acestora. Aceasta poate fi calculată utilizînd ecuația lui Doty: $S^{20} \approx \approx 8 \times 10^{-2} M^{0.35}$. Greutatea moleculară a ADN variază între 1,2 Mdal* (Parcovirus) și 1,7 Mdal la fagii $\Phi X174$, M13 și fd și *E. coli*, care au ca

Fig. 6. — Centrifugarea zonală. A. Tub de plastic conținînd un gradient linear de densitate, cu o soluție inertă necesară pentru a preveni convecția. Proba de analizat este depusă la suprafața gradientului. B. În cursul centrifugării, diferiții componenți ai probei se deplasează formînd benzi la distanțe diferite, în funcție de constanta lor de sedimentare. C. Diferitele fracțiuni sînt colectate într-o serie de tuburi individuale. Benzile își mențin pozițiile relative, deoarece gradientul de densitate împiedică amestecul. D. Rezultatele analizei sînt înscrise într-o curbă, care reflectă diferențele în constanta de sedimentare, ce depind de mărimea, forma și dimensiunea particulei (după Davis și colab., 1976).



genom ADN monocatenar. În cazul virusurilor cu genom dublu catenar, valorile masei moleculare sînt mai mari, fiind cuprinse între 3,4 Mdal la *Polioma* și SV40, 130 Mdal la virusurile *Pox* și 200 Mdal la fagul PBS1 (*B. subtilis*). Cromosomul *E. coli* are $\sim 2,5 \pm 0,3 \times 10^9$ dal. Lungimea moleculelor de ADN este extrem de mare în comparație cu aceea a celu-

* Megadalton (Mdal) = 1×10^6 dal.

lelor în care sînt localizate (tabelul nr. 3). La *E. coli* are $\sim 1\,350\,\mu\text{m}$, ceea ce reprezintă de 400 de ori mărimea celulei, iar la fagul T2 ($\sim 56\,\mu\text{m}$) depășește de 500 de ori lungimea capsidei. Aceste date demonstrează starea extrem de condensată a materialului genetic *in vivo* și ridică probleme importante privind modalitățile de „împachetare”, care să asigure funcționarea lor normală.

Din analiza datelor publicate de Sparrow (1979), precum și de Sparrow și Nauman (1976) rezultă că aproape toate bacteriile au mai mult ADN decît virusurile cunoscute (fig. 7), dar mai puțin decît cele mai

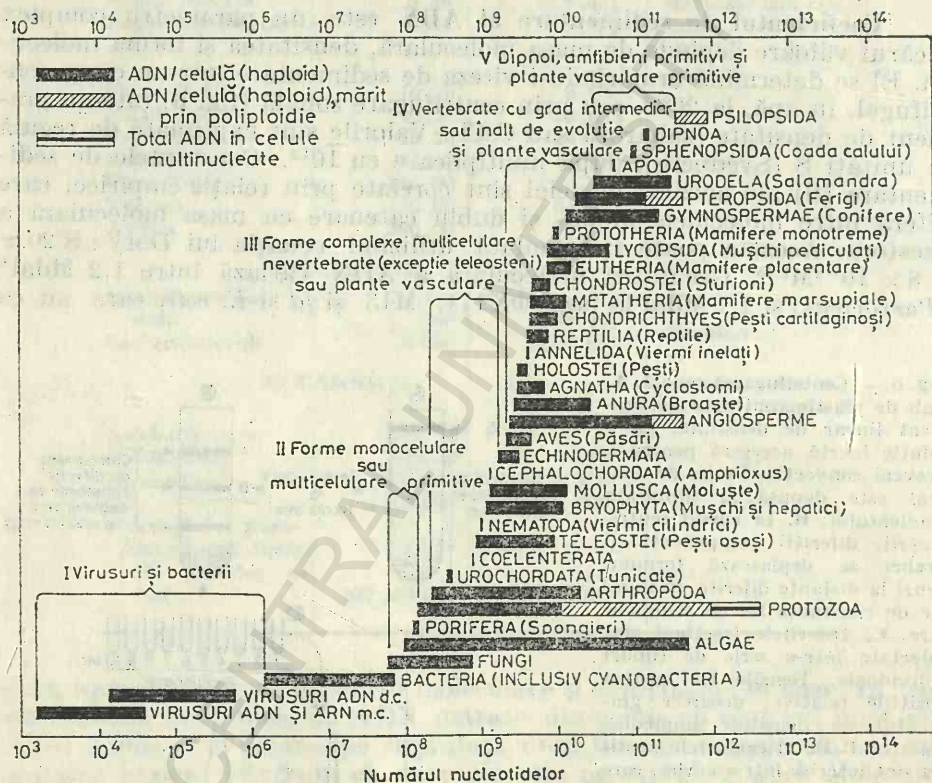


Fig. 7. — Numărul nucleotidelor din materialul genetic la diferite categorii de organisme. Barele negre orizontale reprezintă valorile numărului nucleotidelor la diferite specii din fiecare grup, calculate pe baza greutateii moleculare a complementului haploid al organismelor respective. Se observă o tendință generală de mărire a cantității de ADN la organisme cu complexitate crescândă, deși există și unele excepții.

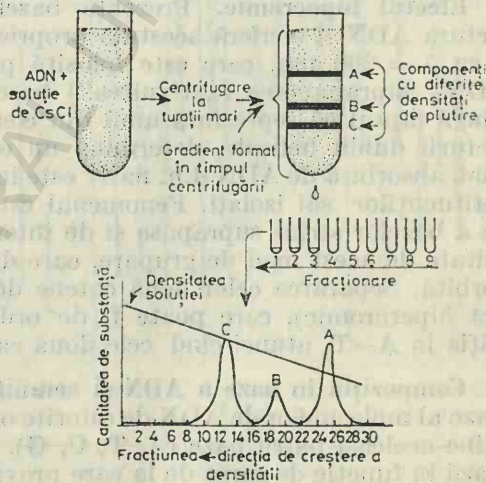
multe celule eucariote. Limita superioară de mărime a ADN bacterian este suprapusă numai peste limitele inferioare de mărime ale genomului unor fungi și alge. Evoluția valorilor ADN/celulă mai mari de 6×10^7 nucleotide (cea mai mare valoare întâlnită la bacterii) coincide cu evoluția sistemelor biologice cu cromosomi multipli și cu organisme care conțin ADN (mitocondrii și cloroplaste). După Sparrow (1976), conținutul în ADN

descriș la *Saccharomyces cerevisiae* $\sim 4,8 \times 10^7$ pb (respectiv $\sim 13\,000$ de gene cu dimensiunea medie de $\sim 1\,500$ pb) ar reprezenta cantitatea minimă de ADN necesar pentru a codifica structurile și metabolismul unei celule eucariote.

Semnificația marilor variații ale conținutului în ADN între diferiți taxoni este puțin explicată. În general, cu cât un organism este mai complex, cu atât cantitatea de informație genetică (respectiv de ADN) necesară pentru creștere, menținere și reproducere este mai mare. La organismele superioare, diferențele cantitative mari pot ține de cantitatea de secvențe redundante.

Densitatea de plutire („buoyant density”) este o proprietate care se măsoară cel mai frecvent prin centrifugare în gradient de echilibru de densitate („equilibrium density gradient centrifugation”). În acest scop, ADN de cercetat este amestecat, într-un tub de plastic, cu o soluție de CsCl care are o greutate moleculară mare și supus centrifugării într-un câmp gravitațional înalt, o perioadă prelungită de timp. Soluția salină formează un gradient de densitate linear, stabil, iar moleculele de ADN prezente în ea se concentrează într-o bandă stabilă situată la nivelul la care densitatea gradientului este egală cu densitatea lor de plutire (echilibru de plutire). După colectarea probelor de la diferite nivele, prezența ADN este reperată spectrofotometric pe baza proprietăților sale optice (fig. 8).

Fig. 8. — Centrifugarea în gradient de densitate la echilibru. Proba de cercetat este amestecată cu soluția unei sări cu g.m. mare (CsCl) pentru a obține un amestec cu o greutate specifică uniformă, egală cu cea a substanței prezentă în probă. După centrifugare la viteză mare, 2—3 zile, pentru a forma un gradient de concentrație și deci de densitate al sării, fiecare component al probei se acumulează în acea poziție a gradientului în care densitatea acestuia este egală cu propria sa densitate de plutire, formând o bandă. Localizarea benzii este independentă de mărimea și forma particulelor, deoarece separarea componentilor se face exclusiv pe baza diferențelor de densitate (după Davis și colab., 1976).



Valoarea densității de plutire la pH neutru depinde de : 1) natura glucidului (riboză sau dezoxiriboză); 2) de structura mono- sau dublu catenară și 3) de raportul de baze exprimat prin proporția G + C%. Moleculele de ARN sînt mai dense decît cele de ADN cu structură catenară echivalentă (mono- sau dublu catenară). ADN m.c. este mai dens decît ADN d.c. cu aceeași compoziție medie în baze, datorită hidratării mai scăzute.

În sfârșit, densitatea ADN d.c. crește linear cu proporția bazelor G + C (fig. 9). De aceea, determinarea densității de plutire furnizează date utile privind conținutul în baze (G + C%), deși unele procese biochimice, ca de exemplu glicozilarea, pot altera relația dintre proporția bazelor și densitate.

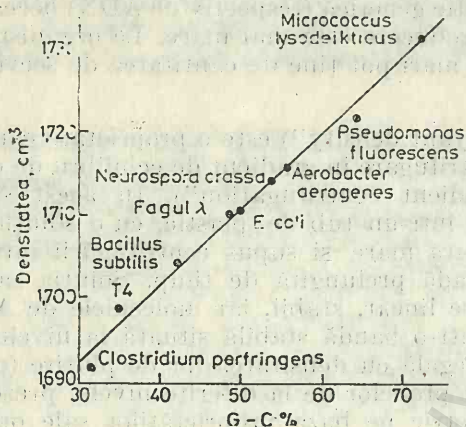


Fig. 9. — Relația dintre densitatea de plutire a ADN dublu catenar și compoziția în baze (după Schildkraut, Marmur și Doty, 1962).

Efectul hipocromic. Prezența bazelor purinice și pirimidinice în structura ADN îi conferă acestuia proprietatea de absorbție a radiațiilor UV cu $\lambda = 260$ nm, care este folosită pentru determinarea cantitativă a ADN. Suprapunerea („stivuirea”) bazelor azotate (engl. „stacking”), pe lângă faptul că reprezintă unul din elementele care conferă stabilitate structurii dublu helicale, determină un efect hipocromic: cantitatea de lumină absorbită de ADN d.h. nativ este inferioară celei absorbite de suma constituenților săi izolați. Fenomenul este determinat de mascarea parțială a bazelor strins suprapuse și de interacțiunile electronice dintre ele, facilitate de acest mod de grupare, care diminuează cantitatea de lumină absorbită. Separarea celor două catene determină o creștere a absorbției (efect hiperchromic), care poate fi de ordinul a 30–40%, în funcție de bogăția în A–T, atunci când cele două catene sînt complet separate.

Compoziția în baze a ADN și semnificația ei. Analiza conținutului în baze al moleculelor de ADN de diferite origini a arătat că deși orice ADN conține aceleași patru baze (A, T, C, G), cantitățile relative ale acestora variază în funcție de sursa de la care provine molecula respectivă. Compoziția în baze se exprimă, în general, în funcție de procentul G + C, raportat la numărul total de baze, sau sub forma raportului molar $\frac{A + T}{G + C}$.

Deși este variabil de la o specie la alta, conținutul în baze este constant și foarte caracteristic pentru un organism dat, iar la organismele multicelulare este același, indiferent de natura celulelor sau a țesutului din care au fost izolate moleculele de ADN. Doty (1961) a arătat că proprietățile fizice ale ADN sînt puternic influențate de procentul G + C în moleculă. Astfel, densitatea unei molecule de ADN este cu atît mai mare cu

cît conținutul său în G + C este mai ridicat și există chiar o relație lineară între densitatea de plutire a diferitelor tipuri de ADN și conținutul lor în G + C (fig. 10).

Ca urmare, se poate determina conținutul în G + C indirect, în funcție de densitatea moleculei de ADN stabilită prin centrifugare în gradient de CsCl. Puterea de rezoluție a tehnicii este foarte mare. Ea este suficientă pentru a separa la eucariote ADN nuclear ($\Delta = 1,706$) de ADN satelit (ADN din mitocondrii și ADN repetitiv din cloroplaste), mai sărac în G + C ($\Delta = 1,694$). Aprecierea conținutului în G + C se mai poate face prin determinarea temperaturii de „topire” (T_m), care este mai mare pentru regiunile ADN bogate în G — C, datorită necesității de a desface trei legături de H, spre deosebire de perechea A—T, care prezintă numai două legături de H (fig. 11).

Fig. 10. — Valorile medii ale compoziției în baze (moli G+C%) caracteristice anumitor genuri și grupuri de genuri bacteriene (după Stanier, 1976):

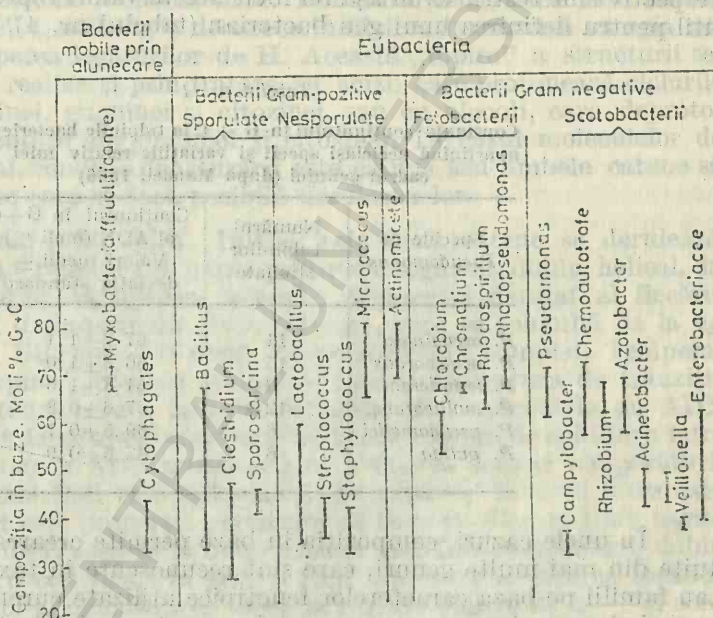
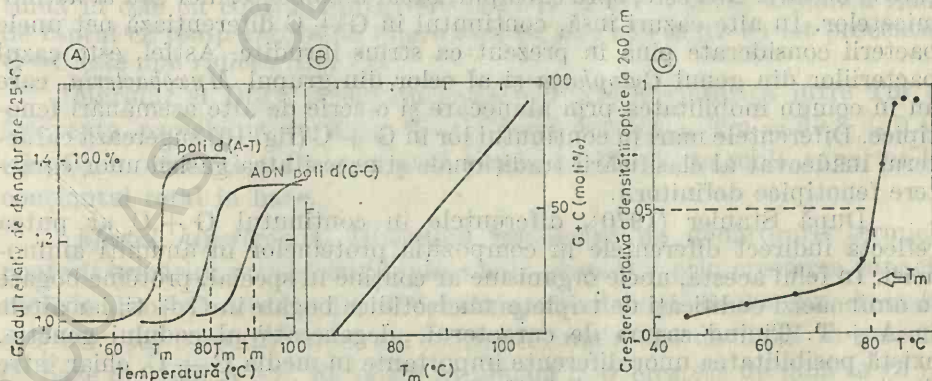


Fig. 11. — Curbele de topire a ADN în funcție de temperatură (A), conținutul în baze (G+C%) (B) și curba de topire a ADN de la *E. coli*, ilustrând efectul hiperromie (C) (după Kornberg, 1980).



Semnificația taxonomică. Variațiile de compoziție cantitativă în baze, ca și omologiile în secvența lor în moleculele de ADN de diferite proveniențe sînt folosite drept criterii taxonomice pentru clasificarea bacteriilor, la care procentul G + C variază în limite foarte largi (22—75 %) în cadrul grupului. S-a demonstrat că, în general, bacteriile care pe criterii morfologice, fiziologice, de antigenitate etc. apar ca înrudite din punct de vedere taxonomic au și o compoziție în baze a ADN asemănătoare. Variația mult mai restrînsă a compoziției în G + C la animalele din grupul vertebratelor nu permite utilizarea ei drept criteriu de stabilire a unor relații filogenetice în cadrul acestui grup. Pînă în prezent au fost determinate valorile G + C pentru un număr important de bacterii (fig. 10). Din analiza datelor respective rezultă că valorile G + C pentru fiecare specie sînt caracteristice, dar că limitele variațiilor lor în cadrul genului respectiv sînt restrînse, în așa fel încît aceste valori reprezintă un caracter util pentru definirea unui gen bacterian (tabelul nr. 4).

Tabelul nr. 4

Constanța conținutului în G + C la tulpinile bacteriene aparținînd aceleiași specii și variațiile relativ mici în cadrul genului (după Mandel, 1966)

Speciile de <i>Pseudomonas</i>	Numărul tulpinilor studiate	Conținutul în G+C al ADN (moli %) Valori medii \pm deviația standard
<i>P. aeruginosa</i>	11	67,2 \pm 1,1
<i>P. acidovorans</i>	15	66,8 \pm 1,0
<i>P. testosteroni</i>	9	61,8 \pm 1,0
<i>P. multivorans</i>	12	67,6 \pm 0,8
<i>P. pseudomallei</i>	6	69,5 \pm 0,7
<i>P. putida</i>	6	62,6 \pm 0,9

În unele cazuri, compoziția în baze permite crearea de grupări alcătuite din mai multe genuri, care sînt recunoscute în taxonomie ca ordine sau familii pe baza caracterelor fenotipice utilizate curent pentru identificare și clasare. Așa este, spre exemplu, cazul mixobacteriilor sau al actinomicetelor. În alte cazuri însă, conținutul în G + C diferențiază net unele bacterii considerate pînă în prezent ca strîns înrudite. Astfel, este cazul bacteriilor din genul *Cytophaga* și al celor din grupul *Mycobacteria*, care au în comun mobilitatea prin alunecare și o serie de alte asemănări fenotipice. Diferențele mari în conținutul lor în G + C (fig. 10) sugerează caracterul inadecvat al clasificării tradiționale și necesitatea găsirii unor caractere fenotipice definitorii.

După Stanier (1970), diferențele în conținutul G + C ar putea reflecta indirect diferențele în compoziția proteinelor în anumiți aminoacizi. În felul acesta, unele organisme ar conține în special, proteine bogate în aminoacizi codificați de triplete nucleotidice bogate în G + C, iar altele în A + T. Ținînd seama de caracterul „degenerat” al codului genetic, există posibilitatea unor diferențe importante în media G + C, chiar între două organisme cu o compoziție identică în aminoacizi, dacă fiecare dintre

ele dispune de o anumită capacitate de selecție *sistematică* în utilizarea anumitor triplete specifice. Astfel, unele organisme ar putea utiliza sistematic pentru a codifica un anumit aminoacid, triplete bogate în G + C, în timp ce alte organisme ar utiliza, cu preponderență, triplete bogate în A + T, pentru a codifica același aminoacid.

Denaturarea și renaturarea ADN. Moleculele de ADN dublu catenar pot suferi modificări importante ale proprietăților lor fizice, ca rezultat al acțiunii unor factori fizici (temperatură, scăderea constantei dielectrice a mediului etc.) sau chimici (modificări de pH, prezența unor substanțe de tipul alcoolilor, cetonelor etc.). Experimental, s-a demonstrat că prin încălzire la temperaturi cuprinse între 63 și 100°C, în funcție de natura și proveniența lor, moleculele de ADN și ARN, parțial sau total dublu catenare, suferă o rupere a legăturilor de H, care leagă în mod normal bazele și se separă în molecule monocatenare. Denaturarea termică este adesea denumită „topire” („melting”) deoarece încălzirea furnizează energia necesară pentru ruperea legăturilor de H. Această „topire” a structurii secundare se poate realiza și prin tratare cu acizi, care protonează ciclurile azotate ale adeninei, guaninei și citozinei, sau cu alcooli, care deprotonează ciclurile azotate ale guaninei și citozinei. În cazul moleculelor de ADN dublu helical, condiția denaturării este ca una sau ambele catene să aibă o extremitate care să facă posibilă derularea lor.

Etapale denaturării ADN. Inițial, cele două catene se derulează parțial, dar rămân reunite cel puțin printr-un segment dublu helical, în care bazele continuă să formeze perechi. Segmentul derulat al fiecărei catene poate lua o conformație întâmplătoare, care se schimbă de la un moment la altul. Ulterior, cele două catene se separă complet. Temperatura medie de topire („melting midpoint”) sau temperatura de tranziție (T_t) reprezintă temperatura la care jumătate din moleculele de ADN dublu catenar sînt denaturate sau, respectiv, temperatura de echilibru între ADN dublu catenar și ADN monocatenar. Valoarea acestei temperaturi, notată convențional T_m , este influențată de numeroși factori, între care cel mai important este proporția perechilor de baze G—C care fiind legate prin trei legături de H asigură în mare măsură stabilitatea structurii dublu helicale. Dovada o constituie în primul rînd faptul că în topirea termică derularea catenelor și denaturarea încep în regiuni bogate în A—T și continuă în cele cu conținut progresiv crescut în G—C și, în al doilea rînd, de faptul că temperatura de topire este cu atît mai mare cu cît procentul G—C este mai ridicat (fig. 12).

Marmur și Doty (1962) au stabilit o relație empirică între T_m și frecvența perechilor de baze G—C, după formula: $T_m = 69,3 + 0,41 (G+C)$, în care (G + C) reprezintă procentul G + C în moli, raportat la conținutul total în baze.

Efectul hiperchromic. Dinamica procesului de denaturare termică poate fi urmărită prin efectul hiperchromic, respectiv prin creșterea capacității de absorbție a radiațiilor UV, la lungimea de undă de 260 nm. Această creștere este corelată direct cu conținutul moleculei de ADN în perechi de baze de tipul A—T. Ea poate să ajungă la o creștere de pînă la 40%,

în așa fel încît absorbția totală a luminii de către moleculele de ADN total denaturat poate fi aproximativ egală celei a unui număr echivalent de nucleotide libere. Efectul hipercromic, care reprezintă modificarea cea mai evidentă după denaturare, este însoțit și de alte modificări, ca de exemplu reducerea la jumătate a masei moleculare, diminuarea viscozității etc.

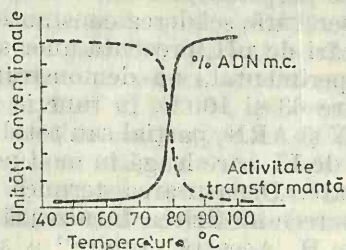


Fig. 12. — Refacerea capacității de transformare genetică a ADN devenit dublu helical prin renaturare.

Renaturarea ADN. Dacă după denaturare completă catenele separate sînt răcite brusc, ele rămîn ca atare: molecula de ADN d.h. a fost denaturată în mod permanent. Dacă răcirea este lentă, pînă la o temperatură inferioară cu 20°C celei de „topire”, energia de activare devine suficientă pentru a facilita apariția unor coliziuni eficiente între cele două catene, urmate de refacerea legăturilor între bazele complementare și refacerea structurii dublu helicale. Procesul de refacere a moleculei de ADN dublu helical este numit *renaturare* („annealing”).

Eficiența procesului de renaturare poate fi apreciată cu ajutorul fragmentelor de ADN cromosomal, care își refac prin renaturare ~ 70% din activitatea de transformare genetică (fig. 12). De asemenea, gradul de renaturare mai poate fi apreciat prin scăderea puterii de absorbție a radiațiilor UV (*efectul hipocromic*), ca și prin modificarea particularităților de sedimentare. În general, temperatura de renaturare este inferioară cu 25°C celei de „topire”. În unele cazuri, ADN și ARN monocatenar denaturat pot forma împerecheri de baze intramoleculare, prin producerea de legături de H, în cazurile în care moleculele respective se pliază în regiuni de complementaritate.

Procesul de renaturare evoluează în două faze: 1) începe cu legarea unui număr limitat de baze și cu formarea unei scurte secvențe dublu catenare și 2) continuă cu rapiditate, asigurînd legarea succesivă a bazelor complementare printr-un mecanism care funcționează ca un fermoar (Kornberg, 1980). Cinetica renaturării unei populații de molecule de ADN diferite reprezintă o măsură destul de exactă și de sensibilă a diferențelor sau a înrudirilor (respectiv a complementarității) secvențelor respective.

Aplicații practice ale fenomenului de denaturare — renaturare. Studiul procesului de denaturare permite aprecieri asupra compoziției în baze a unor molecule de ADN. Înregistrarea continuă sau periodică a cantității de radiații UV absorbite permite stabilirea *profilului de topire* („melting profile”) caracteristic ADN studiat. În general, ADN d.h. bogat în A—T este denaturat la temperaturi mai joase comparativ cu cel bogat

în G—C, care datorită celor trei legături de H necesită temperaturi mai ridicate. Determinarea proporției de baze se face, de regulă, comparînd profilul de „topire” al unei molecule de ADN necunoscut cu cel al unui ADN d.h. de referință, cu compoziția în baze determinată.

Stabilirea hărților de denaturare. Particularitățile procesului de denaturare a ADN d.h. pot fi folosite în practică pentru localizarea regiunilor bogate în A—T. Denaturarea parțială a ADN în condiții de temperatură mai puțin ridicată, sau la concentrații mai joase de agenți chimici (formaldehidă sau dimetilsulfoxid) permite evidențierea la microscopul electronic a regiunilor instabile, în care cele două catene se separă mai ușor datorită bogăției lor în perechi de baze A—T. Se poate face astfel o adevărată hartă a regiunilor instabile bogate în perechi A—T și a celor stabile, bogate în G—C, care rămîn dublu catenare.

Hibridarea moleculară. Una din aplicațiile cele mai importante ale procesului de denaturare—renaturare a ADN d.h. este *hibridarea moleculară* (fig. 13). Ea permite renaturarea prin combinare a unor molecule

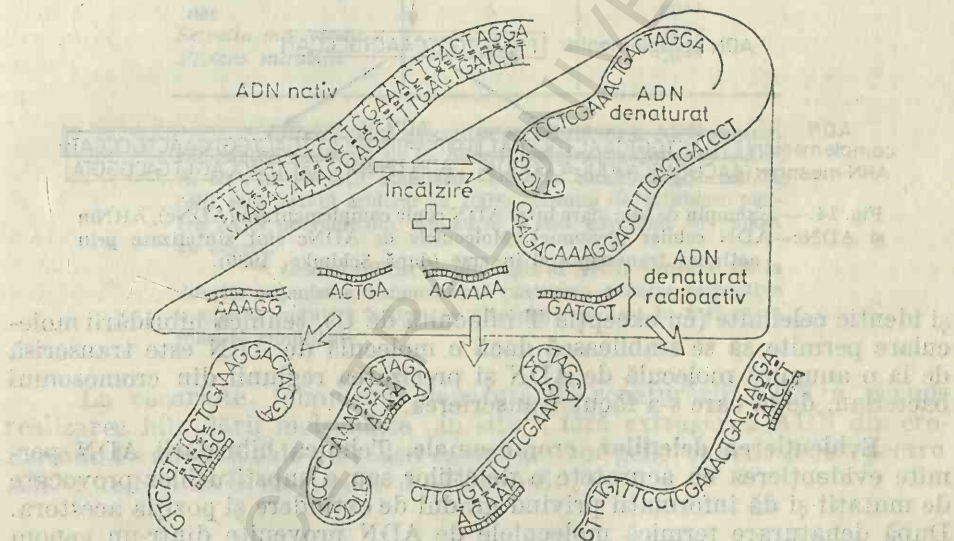


Fig. 13. — Schema unei experiențe de hibridare ADN—ADN. ADN nativ, neradioactiv, și fragmentele mici de ADN radioactiv sînt denaturate prin încălzire și apoi incubate împreună pentru a forma mai multe molecule hibride radioactive, care au compoziția chimică a moleculelor de ADN nativ denaturat (după Davis și Dulbecco, 1976).

de ADN monocatenare sau de ADN și ARN, cu formarea unor molecule hibride (ADN—ADN sau ADN—ARN), indiferent de proveniența lor, cu condiția existenței unui grad de înrudire (respectiv de complementaritate), în secvența bazelor. Detectarea moleculelor hibride se poate face prin microscopie electronică deoarece regiunile dublu catenare prezintă un contur mai gros decît cele monocatenare. Determinarea gradului de hibri-

dare se mai poate face prin marcarea cu ^{32}P și măsurarea radioactivității în fracțiunea de ADN d.h. hibrid izolată prin centrifugare în gradient de CsCl ca și prin autoradiografie, hibridarea pe replici („blotting”) sau după degradarea cu nuclează a fragmentelor monocatenare.

Hibridarea moleculară poate fi utilizată pentru a aprecia gradul de similaritate în secvența bazelor între ADN provenit de la două tulpini sau organisme diferite (fig. 14; tabelul nr. 5). Deoarece ARN este complementar uneia din catenele moleculei de ADN de pe care a fost transcris

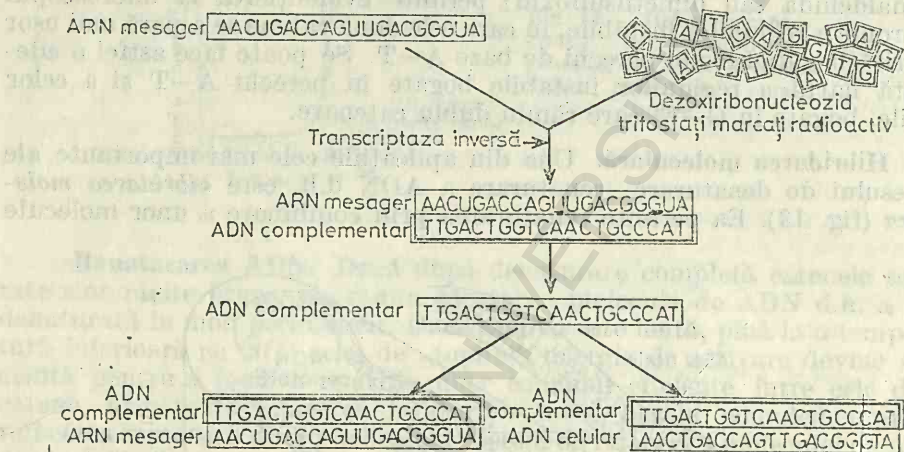


Fig. 14. — Exemplu de hibridare între ADN copie complementară (ADNc), ARNm și ADNc—ADN celular (genomic). Moleculele de ADNc sint sintetizate prin acțiunea transcriptazei inverse (după Schimke, 1980).

și identic celeilalte (cu excepția T înlocuită de U), tehnica hibridării moleculare permite să se stabilească dacă o moleculă de ARN este transcrisă de la o anumită moleculă de ADN și precizarea regiunii din cromosomul bacterian, de la care s-a făcut transcrierea.

Evidențierea delețiilor cromosomale. Tehnica hibridării ADN permite evidențierea cu acuratețe a delețiilor sau a substituțiilor provocate de mutații și dă informații privind gradul de extindere și poziția acestora. După denaturare termică moleculele de ADN provenite dintr-un genom de tip sălbatic și din genomul mutant puse în condiții favorabile pentru renaturare, formează un heteroduplex. Reasocierea este perfectă, cu excepția regiunii în care s-a produs deleția sau a regiunii în care una din catene este lipsită de complementaritate. Molecula heteroduplex prezintă în acest caz o *bucă de deleție* („D-loop”).

Tehnica are o sensibilitate foarte mare. În cazul cuplului ADN de fag λ , de tip sălbatic și de tip λ mutant, ea poate evidenția o deleție de ~100 nucleotide (Westmoreland și colab., 1969). Există, de asemenea, posibilitatea de a hibrida ARNm cu ADN, pentru a determina localizarea situsurilor de transcriere. În anumite condiții, hibridii ADN—ARN sint mai stabili decât cei ADN—ADN și permit evidențierea unor *bucle de hibridare* („R-loop”). În acest caz, un braț al buclei este dublu catenar,

iar celălalt, deplasat pentru a forma bucla, este monocatenar. Utilizând această tehnică, numită *cartarea buclilor R* („R-loop mapping”), Thomas (1976) a pus în evidență fenomenul de înădire sau de „sudare” („splitting”) la ARNm de tip eucariot. Cind moleculele de ARN sînt foarte mici, ca în cazul ARNt, se recomandă marcarea lor cu feritină ce conține atomi de Fe, opaci față de electroni, care înlesnesc evidențierea pe microelectronografii (Wu și Davidson, 1977).

Tabelul nr. 5

Gradul de omologie între *Escherichia coli* și alte bacterii din grupul enteric determinat prin tehnica de hibridare a acizilor nucleici (după Brenner și Falkow, 1971)

Bacteria	Procentul de hibridare a ADN	Procentul de hibridare a ARN ribosomal
<i>Escherichia coli</i>	100*	100
<i>Shigella flexnerii</i>	83	92**
<i>Salmonella typhi</i>	6	79**
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	80**
<i>Serratia marcescens</i>	3	74**
<i>Proteus mirabilis</i>	1,5	76**

* Cifrele indică procentul de hibridare a ADN marcat radioactiv, provenit de la diferite microorganisme cu ADN *E. coli*, în condiții standard. Reacția omologă (*E. coli/E. coli*) este notată arbitrar cu 100%. Gradul de hibridare pentru ADN provenit din alte surse a fost exprimat în raport cu acesta.

** Gradul ridicat de omologie al ARNr provenit de la diferite organisme demonstrează păstrarea genelor respective în cursul evoluției, în timp ce alte gene au fost în mai mare măsură modificate.

La eucariote, fenomenul denaturării—renaturării ADN a permis realizarea hibridării moleculare „in situ”, fără extragerea ADN din cromosom. Pe această cale s-a reușit cartarea unor gene, cum ar fi cele pentru ARNr 18 S și 28 S, ca și pentru ARNr 5 S.

Funcțiile ADN ca material genetic

Datorită progreselor biologiei moleculare, care au permis izolarea și identificarea enzimelor, izolarea, secvențializarea și chiar sinteza unor gene au devenit posibile stabilirea și înțelegerea mecanismului molecular al multiplelor funcții ale ADN ca material genetic (fig. 15, tabelul nr. 6).

Funcția de depozitar al informației genetice. Materialul genetic — ADN sau, la unele virusuri, ARN — poartă înscris în structura sa, sub forma unui cod chimic, totalitatea informației genetice necesară pentru dirijarea întregii activități biologice specifice a organismului respectiv

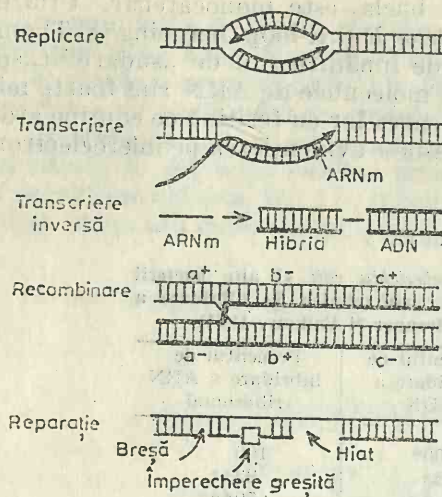


Fig. 15. — Funcțiile multiple ale ADN (după Kornberg, 1980).

Tabelul nr. 6

Unele funcții ale ADN și enzimele implicate în efectuarea lor (modificat după Kornberg, 1980)

Funcțiile	Schema reacției generale *	Enzimele implicate **
Replicare	$n(\text{dNTP}) \xrightarrow{\text{ADN}} (\text{dNMP})_n$	1, 2, 4, 5, 6
Transcriere genetică	$n(\text{rNTP}) \xrightarrow{\text{ADN}} (\text{rNMP})_n$	2
Transcriere inversă	$n(\text{dNTP}) \xrightarrow{\text{ARN}} (\text{dNMP})_n$	3
Recombinare ***	$\text{ADN} + \text{ADN} \rightarrow \text{ADN (recomb.)}$ $a^+b^-c^+ + a^-b^+c^- \rightarrow a^+b^+c^- + a^-b^-c^+$	1, 4, 5, 6
Reparație	$\text{ADN (cu defect)} \rightarrow \text{ADN (reparat)}$	1, 4, 5
Modificare	$\text{ADN} \rightarrow \text{ADN (metilat sau glicozilat)}$	7
Restricție	$\text{ADN} \rightarrow \text{fragmente de ADN}$	5

* d = 2'-deoxiribo; r = ribo; NMP = nucleozid 5-fosfat; NTP = nucleozid trifosfat.

** Cheia enzimelor: 1. ADN-polimeraza (dependentă de ADN); 2. ARN-polimeraza (dependentă de ADN); 3. Transcriptaza inversă (ADN-polimeraza, dependentă de ARN); 4. Ligaze; 5. Exonucleaze și endonucleaze; 6. Proteine de legare și derulare („unwinding proteins”); 7. Metil- și glicozil transferaze.

*** a⁺b⁻c⁺ reprezintă aranjamentul și funcția normală (+) sau absentă (-) a genelor respective, într-un segment ipotetic de ADN.

sau, în cazul virusurilor, a unora dintre procesele metabolice ale celulelor-gază parazitare. Această particularitate specifică materialului genetic este condiționată de funcția sa de „matriță”, „tipar” sau model (engl. „template”)*, grație căreia natura produsului rezultat dintr-o activitate celulară dirijată de el este integral determinată de natura modelului ei, depozitar de informație genetică.

Replicarea, funcție esențială a materialului genetic, este un proces biochimic foarte specific prin care secvența bazelor din fiecare dintre catenele moleculei de ADN — sau de ARN cu funcție genetică — eliberate după desfacerea legăturilor intercatenare de H, dictează secvența bazelor din catenele complementare în curs de constituire. Datorită acestei specificități, în celulele-fiice se transmit, în urma diviziunii celulare, copii identice ale genomului celulei-mamă. Replicarea de acest tip are ca rezultat formarea unui nou genom constituit din ADN, atunci când modelul sau matricea este ADN, sau din ARN, în cazul când materialul-matriță este ARN, așa cum se întâmplă la unele virusuri și bacteriofagi.

Transcrierea și traducerea genetică. Pornind tot de la ADN ca matriță, se sintetizează în celulă și ARN mesager sau de mesaj (ARN_m), ceea ce corespunde unei alte funcții specifice a materialului genetic, aceea de „transcriere” a informației genetice conținute în nucleu și de transmitere a ei sub această formă în citoplasmă la ribosomi; la nivelul acestora, informația este decodificată sau „tradusă” într-un produs nou, care constituie tocmai rezultatul biosintezei proteinelor.

Materialul genetic al unei celule este susceptibil de modificare fie prin încorporarea unui fragment de material genetic exogen — în procesul de recombinare genetică — fie prin mutație, fenomen spontan sau indus, constând în adăugarea, pierderea, substituirea sau inversarea ordinii unor baze într-una din secvențele polinucleotidului. O dată modificată, „matrița” se replică în continuare, astfel încât descendenții celulei cu un genom schimbat în structura lui posedă o informație genetică alterată, a cărei „transcriere” și „traducere” generează apariția unor caractere noi sau pierderea și modificarea caracterelor originare.

Sistemele biologice sînt dotate cu mecanisme subtile ce asigură prin acțiunea endonucleazelor de restricție, degradarea ADN străin, care ar putea pătrunde de la exterior și protecția materialului genetic propriu, prin sistemele de modificare. De asemenea, ele dispun de mecanisme foarte eficiente de reparație a ADN, menite să corecteze erorile rezultate în urma unei replicări imperfecte sau în urma mutațiilor.

În sfîrșit, ele dispun de o gamă de mecanisme foarte exacte de reglare și control al activităților celulare. Aceste mecanisme, care reprezintă, de

* În concepția lui Pontecorvo (1966), calitatea de „template” caracterizează un „model” sau „o matriță” macromoleculară utilizată pentru sinteza unei alte macromolecule. Prin procesele „template” un număr limitat de blocuri de construcție (patru pentru acizii nucleici și 20 pentru proteine) sînt polimerizate în structuri macromoleculare; în care aranjarea efectivă a blocurilor de construcție (*dialaxia*) este determinată numai de ordinea preexistentă, care este fie identică, fie complementară, fie înrudită în alt mod cu macromolecula nou sintetizată. În felul acesta, particularitățile produsului de biosinteză sînt predeterminate de caracterul unic al matriței. Procesele „template” cel mai bine cunoscute sînt replicarea ADN, transcrierea și traducerea genetică (Rieger și colab., 1976).

asemenea, o funcție specifică a materialului genetic, se exercită prin intermediul unor „semnale” chimice specifice, grație cărora se realizează coordonarea dintre replicare și biosinteza proteinelor. Această acțiune reglatoare se realizează pe două căi : a) *activă*, în care materialul genetic acționează ca „emittător” de „semnale” chimice, determinind structura primară — și deci proprietățile — unor substanțe proteice cu funcții reglatoare specifice, prin intermediul cărora se stabilesc sau se transmit toate interacțiunile implicate în menținerea echilibrului intracelular ; b) *pasivă*, în care materialul genetic se comportă ca „receptor” de semnale chimice, în sensul că diferite secvențe specifice ale moleculei de ADN (cu funcții reglatoare), controlează inițierea și desfășurarea unor procese ca replicarea, sub influența unor semnale chimice, oglindind starea funcțională a celulei în fiecare moment.

Din această enumerare rezultă rolul esențial al materialului genetic nu numai în determinarea arhitecturii celulare, în dirijarea coordonată a activităților biochimice în acord cu semnalele și stimulii externi, ci și ca deținător fizic al istoriei evolutive a organismului respectiv.

Argumente privind rolul genetic al acizilor nucleici

Deși existența acizilor nucleici a fost evidențiată încă din anul 1874, ipoteza că proteinele ar fi principalele molecule purtătoare de informație genetică a persistat timp îndelungat. Ea era bazată pe prezența lor constantă în toate sistemele biologice, prin proporția însemnată cantitativ și pe ideea că, fiind formate din douăzeci de aminoacizi, ar fi asigurat practic posibilitatea unei mari variabilități de structuri moleculare, care stau la baza diversității lumii vii.

Cu toate acestea, mai multe fapte de observație au sugerat asocierea ADN cu funcția de purtător al informației genetice. Între acestea se pot cita :

- 1) Prezența lui constantă în toate celulele.
- 2) Distribuția, obișnuit sub formă cromosomală (localizată în nucleu), într-o cantitate fixă pentru o anumită celulă și proporțională cu numărul cromosomilor ei, caracteristic organismului respectiv (Mirsky și Ris, 1949).
- 3) În celulele germinale ale organismelor superioare, care sînt haploide, cantitatea de ADN reprezintă exact jumătate din cea caracteristică celulelor somatice, diploide.
- 4) Caracterul său metabolic stabil care asigură transmiterea intactă în cursul diviziunii celulare, demonstrat prin numeroase probe genetice. Stabilitatea metabolică este demonstrată și prin faptul că în ADN provenit de la o specie dată compoziția în baze nu se schimbă cu vîrsta și starea nutrițională, nici sub influența factorilor de mediu. Aceste particularități demonstrează individualitatea și stabilitatea ADN, care se păstrează ca atare în cursul diviziunilor celulare.
- 5) Coincidența dintre acțiunea mutagenă maximă a radiațiilor UV cu lungime de undă de 253,7 nm și zona de absorbție maximă a acestor radiații de către ADN.

Utilizarea virusurilor și a microorganismelor ca model experimental a făcut posibilă obținerea unor probe hotărâtoare privind rolul genetic al acizilor nucleici. Una din descoperirile fundamentale ale geneticii contemporane a fost realizată de Avery, MacLeod și McCarty (1944), prin demonstrarea rolului ADN, sub forma unui fragment de cromosom bacterian, în transformarea genetică, descrisă la pneumococ (*Streptococcus pneumoniae*) de Griffith (1928). Anularea efectului transformant sub acțiunea dezoxiribonucleazei constituie o dovadă suplimentară a funcției genetice a ADN.

Hershey și Chase (1952), lucrând cu fagul T2, au obținut două preparate fagice, pe care le-au marcat separat cu ^{35}S , care este încorporat numai în proteine, și cu ^{32}P , care este încorporat în acizii nucleici. Fiecare preparat este pus în condiția de a infecta câte o cultură de *E. coli*. După un scurt interval de timp și apoi la intervale regulate, se recoltează probe din culturile respective, care sunt agitate puternic într-un omogenizator („waring blender”). Determinarea radioactivității celulelor bacteriene și a lichidului extracelular demonstrează că ~ 80% din proteina fagică marcată cu ^{35}S este găsită extracelular, în timp ce cea mai mare parte din ^{32}P este în celule și numai ~ 30% în mediu (fig. 16). Experiența demon-

Fig. 16. — Reprezentarea schematică a experienței lui Hershey și Chase. Fagii T2, marcați cu ^{32}P sau ^{35}S , sunt puși separat în condiții favorabile pentru infectarea *E. coli*, pentru a demonstra că ADN este unicul purtător al informației genetice.

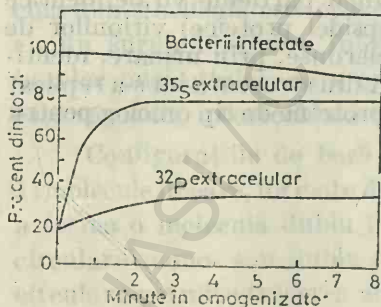
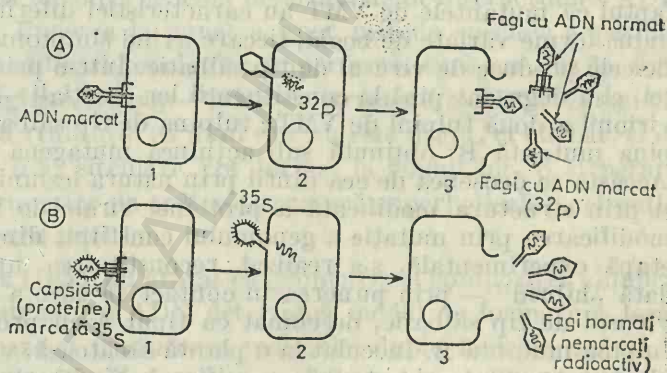


Fig. 17. — Experiența lui Hershey și Chase. Agitarea violentă în mixer a bacteriilor înainte de a fi lizate arată, în cazul fagilor marcați cu ^{32}P , că cea mai mare parte din radioactivitate este asociată cu celulele bacteriene, iar în cazul celor marcați cu ^{35}S , că 80% din radioactivitate este prezentă extracelular (după Hershey și Chase, 1952).

strează că infecția celulelor bacteriene este produsă exclusiv cu ADN fagic, care pătrunde în celulă, în timp ce capsida proteică rămâne la exterior (fig. 17). Cu toate acestea, bacteriile lizate eliberează particule fagice ma-

ture. Aceasta dovedește că sinteza proteinelor învelișului fagic, ca și multiplicarea acestuia în celulele infectate au fost induse exclusiv de ADN viral, care deține în structura sa informația genetică pentru ambele procese.

Gierer și Schramm (1956) și Fraenkel—Conrat (1957), lucrind cu virusul mozaicului tutunului (VMT), au demonstrat că la acest virus lipsit de ADN, rolul de purtător al informației genetice este jucat de ARN, care este infectant și în stare pură, pe cînd proteina virală izolată este neinfecțantă, deci genetic inertă. Într-adevăr, introdus la o plantă sensibilă sănătoasă, ARN pur induce formarea de virioni compleți, constituiți din ARN învelit într-o capsidă proteică. Dacă, pe de altă parte, cele două fracțiuni ale virusului — ARN și proteina — erau puse în contact *in vitro*, ele se reuniau automat, printr-un proces de autoasamblare asemănător celui de cristalizare, pentru a forma virus complet, matur, cu morfologia sa caracteristică și foarte infecțios. Capacitatea de autoasamblare se datorește uniformității structurale a celor 2130 de molecule de proteină, care au toate aceeași mărime specifică, aceeași formă și aceeași secvență specifică a aminoacizilor.

Pornind de la descoperirea proprietății de autoasamblare, Fraenkel—Conrat a efectuat o nouă experiență care a adus o probă suplimentară convingătoare asupra rolului genetic al acidului nucleic, bazîndu-se pe faptul că mutantele de VMT au caracteristici diferite de infecțiozitate și induc forme variate de boală, fiecare avînd simptome distincte, deosebite de cele produse de virusul de tip sălbatic. Într-o primă etapă a experienței, el a degradat pînă la constituentii lor esențiali — ARN și proteină — virionii a două tulpini de VMT: tulpina de tip sălbatic normală A și tulpina mutantă B, obținută sub acțiunea mutagenă a acidului nitros. Aceasta se deosebea de cea dintîi prin natura leziunilor produse la plante și prin structura modificată a proteinei virale de înveliș, rezultînd din modificarea prin mutație a genomului constituit din ARN. Într-o a doua etapă experimentală, s-a realizat reconstituirea unui virus — de astă dată „hibrid” — prin punerea în contact *in vitro* a ARN provenit de la virusul de tip sălbatic, desemnat ca tipul A cu proteina separată de la tulpina mutantă B. Inoculat la o plantă sănătoasă, virusul „hibrid” astfel obținut producea simptomele specifice bolii determinate de virusul sălbatic A, iar din planta bolnavă se izolau numai particule virale identice prin toate caracterele (inclusiv structura capsidei proteice) virionilor de tipul A. Virusul „hibrid” creat *in vitro* își pierduse, prin urmare, identitatea în planta-gazdă, deoarece ARN de tip A din structura lui s-a replicat ca atare, dar a determinat și biosinteza unei proteine de tip omolog pentru constituirea capsidei noilor particule virale.

Enzimele care modifică topologia ADN.

Topoizomerazele și structura terțiară a ADN

*„Dubla helice perfectă a ADN nu există
decît pe coperțile manualelor de biologie“*

M. MORANGE

Imaginile moleculelor de ADN izolate din virioni și din celule, obținute prin microscopie electronică, sînt înșelătoare, deoarece nu reușesc să le evidențieze în stare superhelică și condensată de sute sau de mii de ori, cum sînt în realitate (Earnshaw și colab., 1978). Pe eluerările, în cursul izolării lor, distrug sau modifică particularitățile de structură terțiară rezultate din răsucirea lor superhelică determinată de interacțiunea ADN cu diferite proteine. Punerea la punct a unor metode speciale a permis evidențierea unor modificări topologice importante, care au dus la concluzia că modelul originar Watson—Crick de structură a ADN, reprezintă doar o aproximare a realității, că axul său nu este drept, ci curbat, și că frecvent moleculele d.h. circulare pot forma, la rîndul lor, o structură helică cu un grad superior de ordine (structură superhelică), cel puțin o parte din timpul existenței lor.

Watson și Crick (1953) au arătat că geometria și compoziția chimică a subunităților din structura ADN determină modul de formare a legăturilor de H între baze și producerea moleculei dublu helicale, avînd la exterior resturile de glucid și fosfat, iar perechile de baze la interior. Molecula dublu helică este orientată spre dreapta, respectiv în aceeași direcție ca un șurub obișnuit. Informația genetică este conținută în secvența bazelor nucleotidice, care este independentă de modul în care molecula este răsucită, întortochiată sau innodată (Wang, 1982).

Configurațiile de bază ale duplexului de ADN includ (fig. 18): 1) molecule lineare, formate din două catene împletite una față de alta, pentru a forma o moleculă dublu helică (coaxială cu axul linear); 2) molecule circulare mono- sau dublu catenare (incizia unei catene a moleculei d.c. circulare permite trecerea acesteia într-o stare numită relaxată); 3) molecula circulară închisă suferă frecvent o suprarăsucire față de ea însăși, cu formarea de ADN superhelică sau superspiralizat („supercoiled”). Fig. 19 prezintă schematic principalele forme topologice ale ADN existente în genomurile virale, bacteriene și ale organitelor.

Structura ADN

Monocatenar
circular

Exemple

Fagii ϕ X, M13 și fd

Cromosomii bacterieni
E.coli și B.subtilis

Cromosomii organelor:
ADN din mitocondrii
și cloroplaste

ADN fag PM 2

Formele intracelulare
ale fagilor ϕ M13, fd, λ
și P2

ADN virusuri oncogene
SV 40 și polioma

Fagii λ și P2

Fagii T3 și T7

Fagii T2, T4, T6 și P22

Dublu catenar
circular închis
covalent

Două incizii
la situri
specifice

Ligază

ADN linear cu
extremități
adezive expuse

Exonuclează 3'

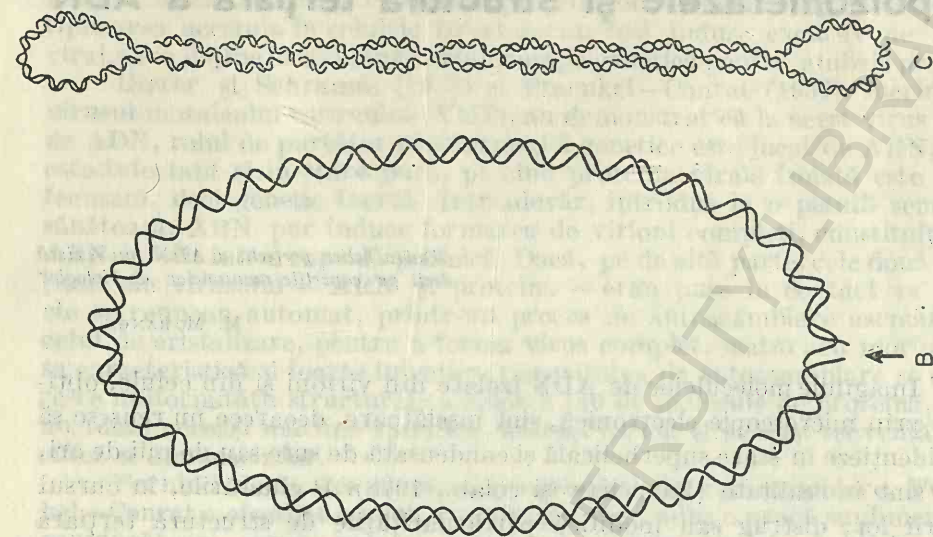
ADN linear cu
extremități
adezive mascate

ADN linear cu
extremități
adezive mascate
permutate circular

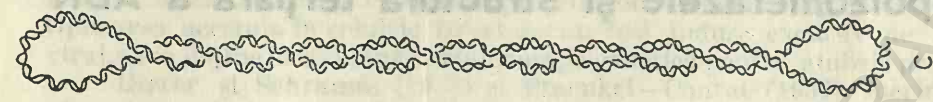
ABCD
abcd
BCD
bcd
CD
cd



A



B



C

Fig. 18. — Configurațiile fundamentale ale ADN dublu helical
incluind forma lineară (A) circulară relaxată (B) (cu o incizie
monocatenară (1) și circulară închisă (C) (necincizată, deci
superhelicală) (după Bauer, Crick și White, 1980).

Fig. 19. — Diferitele forme topologice ale moleculelor de ADN. Exem-
plele se referă la virusuri, bacterii și organisme (după Dressler, 1975).

Proprietățile topologice ale ADN. Conceptul de „suprarăsucire“

Proprietățile topologice * depind de aranjamentul spațial (tridimensional) al structurilor. Ele sînt foarte diferite de proprietățile geometrice și au drept caracter esențial invarianța, respectiv capacitatea de a rămîne nealterate cînd forma structurii (proprietatea geometrică) este modificată. Ca urmare, din punct de vedere topologic un cerc este echivalent cu un pătrat și o sferă cu un elipsoid.

Structura dublu helicală a ADN a fost analizată inițial în fibrele cristaline, în care catenele se rotesc una în jurul celeilalte la fiecare 10 pb, pentru a forma structura de tip B Watson și Crick (Wang, 1982; Klug, 1982). În moleculele lineare native, cele două catene efectuează un tur de helice complet la fiecare 10,5 pb, corespunzînd configurației celei mai stabile a moleculei. În cazul moleculelor de ADN d.c. lineare, modificarea gradului de torsiune într-o anumită zonă a duplexului nu provoacă constrîngerii în structura acestuia, deoarece extremitățile moleculei sînt libere să se răsucească una în raport cu cealaltă.

Situația este complet diferită în cazul moleculelor d.h. circulare închise. Ele se prezintă într-o „stare relaxată” dacă una din catene este incizată. În schimb, în cazul moleculelor dublu helicale circulare închise covalent, cum este cazul genomurilor virale, al plasmidelor și al cromosomilor bacterieni, deoarece tensiunea nu se poate deplasa spre extremitățile libere, apar fenomene de suprarăsucire sau de superspiralizare.

Vinograd (1968, 1970) a introdus conceptul de suprarăsucire sau de superspiralizare (folosind termenii de „supertwisting, supercoiling sau superhelicity”) pentru a descrie răsucirea moleculelor de ADN d.c. față de ele înșile, așa cum se răsucește un cordon spiralat de receptor telefonic. Considerată inițial ca un artefact sau ca o caracteristică limitată la moleculele mici (ADN viral și plasmidial), suprarăsucirea pare să fie o proprietate universală a moleculelor de ADN d.h., fiind prezentă nu numai în cazul celor circulare închise, dar și la moleculele de ADN linear (T4, λ , P1) care se circularizează *in vivo*, ca și la eucariote.

Bauer, Crick și White (1980) au caracterizat una din proprietățile topologice cele mai importante ale moleculelor de ADN d.c. circulare închise și anume numărul de înlănțuiri („linking number”). El este reprezentat de numărul rotațiilor pe care o catenă o face în jurul celeilalte. Cînd numărul înlănțuirilor este egal cu raportul dintre numărul total al perechilor de baze nucleotidice și numărul perechilor de baze pe tur de helice (10,5 pb), se spune că molecula de ADN d.c. circulară închisă este în configurație relaxată. Modificările numărului de înlănțuiri în molecula de ADN d.c. circular închis au fost urmărite prin microscopie electronică și prin electroforeză în gel de agaroză, cu ajutorul bromurei de etidiu. Moleculele plane ale acestora se intercalează între două perechi de baze ale ADN, permițînd modificarea numărului de înlănțuiri. Fiecare moleculă de bromură de etidiu derulează duplexul cu 26°, iar 14 molecule derulează un tur de helice complet, scăzînd numărul de înlănțuiri cu o unitate.

* Topologia este o ramură a științelor matematice bazată pe studiul deformărilor continue ale geometriei unor structuri.

Reducerea numărului de înălțuri sub cel caracteristic stării relaxate modifică configurația topologică a moleculei, care apare la microscopul electronic suprarăsucită și mai compactă decât cele relaxate (fig. 20).

Suprarăsucirile (respectiv răsucirile duplexului) spre dreapta în același sens cu dubla helice, însoțite de reducerea numărului de înălțuri (corespunzând unui număr mai mare de 10,5 pb pe tur de helice) sunt numite *negative*. Suprarăsucirile spre stînga, însoțite de o creștere a numărului de

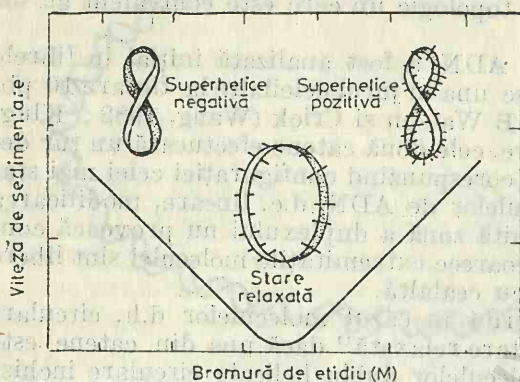
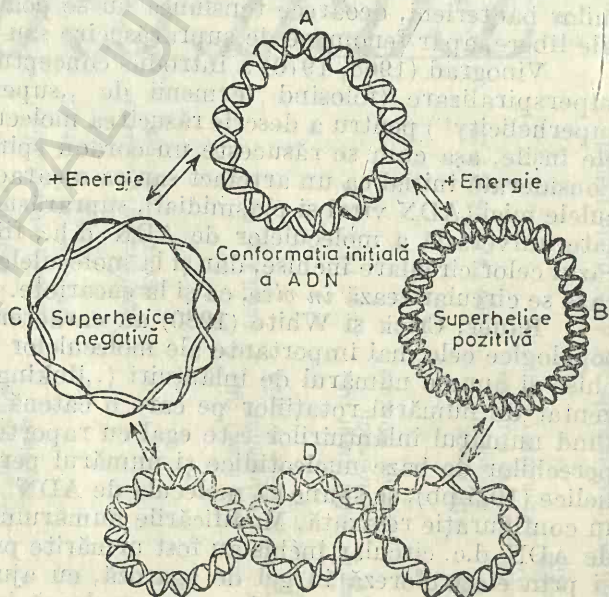


Fig. 20. — Efectul intercalării moleculelor de bromură de etidiu într-un duplex de ADN circular închis. Molecula suprarăsucită negativ la o concentrație intermediară de bromură de etidiu este relaxată prin intercalare într-o formă extinsă care sedimentează lent. O intercalare extensivă la concentrații mari de bromură de etidiu introduce superture pozitive, care fac molecula mai compactă și sedimentabilă din nou mai rapid (după Kornberg, 1980).

Fig. 21. — Modificările topologice ale ADN dublu helical circular închis. Conformația inițială a moleculei (A) poate fi modificată de enzime, care introduc suprarăsuciri pozitive sau negative, cu consum de energie. Revenirea la structura inițială relaxată se face fără consum de energie. Schimbările locale de torsiune a helixului produc tensiuni care fac să apară fie suprarăsuciri pozitive, care strâng pasul helixului (B), fie suprarăsuciri negative, care îl relaxează (C). În ansamblu, moleculele cu suprarăsuciri iau aspectul cifrei opt (D) (după Morange, 1980).



înălțuri (respectiv avînd un număr de pb pe tur de helice mai mic decît 10,5) sunt numite *pozitive* (Vinograd, 1970) (fig. 21). În general, moleculele de ADN d.c. circulare închise, cu structură superhelică negativă, sînt prezente în celulele vii, în timp ce cele superhelicale integral pozitive au fost obținute în special în laborator. Apariția acestor configurații topo-

gice intracelular este rezultatul numeroaselor constrîngerii de torsiune determinate în special de interacțiunea cu proteinele. Datorită structurii circulare închise, aceste constrîngerii nu pot fi compensate prin rotația extremităților libere (ca la moleculele lineare sau încizate) și, ca urmare, se traduc prin procese de superspiralare. Dacă torsiunea este foarte puternică, în anumite regiuni, cele două catene se pot separa local, permițînd interacțiunea cu anumite enzime.

Topoizomerazele

Topoizomerazele sînt enzime capabile să modifice structura terțiară a ADN fie prin relaxarea ADN superhelical, fie prin capacitatea de a catena sau de a decatena, de a înnoda („knotting”) sau de a desnoda („unknotting”) ADN circular închis covalent. Face excepție ADN-giraza *E. coli* a cărei funcție principală este de a induce procese de suprarăsucire negativă în structura moleculelor de ADN circulare închise, relaxate sau suprarăsuците pozitiv. După Cozzarelli (1980), catenarea (catenation) propriu-zisă corespunde situației în care sînt înălțuite două molecule de ADN diferite, în timp ce înnodarea are loc în aceeași moleculă (catenare intramoleculară).

Deoarece catenarea nu depinde de omologia secvențelor nucleotidice, pot fi înălțuite molecule de ADN circulare provenite din surse foarte diferite. Enzimele care modifică topologia ADN au fost descrise sub diferite denumiri („swivelaza”, „nicking-closing enzyme”, „DNA-relaxation-enzyme”, „DNA-untwisting enzyme”), iar cel mai recent cu termenul generic de topoizomeraze sau de enzime capabile să interconvertească izomerii topologici ai ADN (Wang și colab., 1980; Liu, 1980).

Numeroasele topoizomeraze descrise la procariote și eucariote sînt grupate în două categorii: 1) Topoizomerazele de tip I, avînd ca prototip proteina omega de la *E. coli* și enzimele de incizie și sudare („nicking-closing”) de la eucariote, secționează o singură catenă de ADN; 2) topoizomerazele de tip II, ca de exemplu ADN-giraza *E. coli* și topoizomeraza fagului T₄ care secționează ambele catene ale ADN d.h. Conversiile topologice produse de aceste enzime au o caracteristică fundamentală comună. După secționarea ADN, ele determină translocația unui segment de ADN prin breșa formată, înainte ca extremitățile breșei să se reunească. Deci aceeași moleculă enzimatică secționează, transferă și resudează ADN.

Conceptul de topoimerie. Topoimerii sînt molecule de ADN cu structuri primare și secundare identice, care diferă însă în structura lor terțiară, adică în topologie. Denumirile de topoimeri și topoizomeraze au fost date prin analogie cu cele de izomeri din chimie. Două molecule sînt izomere cînd au aceeași formulă moleculară globală, iar structura lor chimică este diferită. Două molecule de ADN d.c. circular care au aceeași secvență de baze, dar un număr diferit de înălțuiri și suprarăsuciri sînt topoizomere, întrucît diferențele dintre ele sînt de natură topologică.

Topoizomerazele de tip I, numite și enzimele de incizie și închidere sau de sudare, au fost descrise inițial de Wang (1971), sub denumirea de proteina omega (ω) la *E. coli*. Aceasta conține 895 de aminoacizi, a căror

secvență a fost determinată indirect, pe baza secvenței nucleotidelor în gena codificatoare.

Proprietăți. Topoizomerazele de tip I secționează o singură catenă a ADN d.c., putînd determina mai multe operații topologice, datorită faptului că reunește proprietățile a două enzime, endonucleaza și ligaza. Ele ar acționa suprimînd o singură legătură covalentă între moleculele de glucid și fosfat, concomitent cu legarea unei molecule de apă. După translocția unui segment de ADN prin breșa astfel creată, aceasta este închisă, cu eliminarea moleculei de H_2O .

Fără a contesta această comportare, Wang (1982) nu este de acord cu acest mecanism biochimic, deoarece funcția ligazică necesită prezența unui cofactor (consum de energie), reprezentat de NAD^+ în cazul ligazelor bacteriene sau de ATP în cazul ligazelor celor alte organisme.

Fig. 22. prezintă conversiile topologice induse de topoizomerazele de tip I:

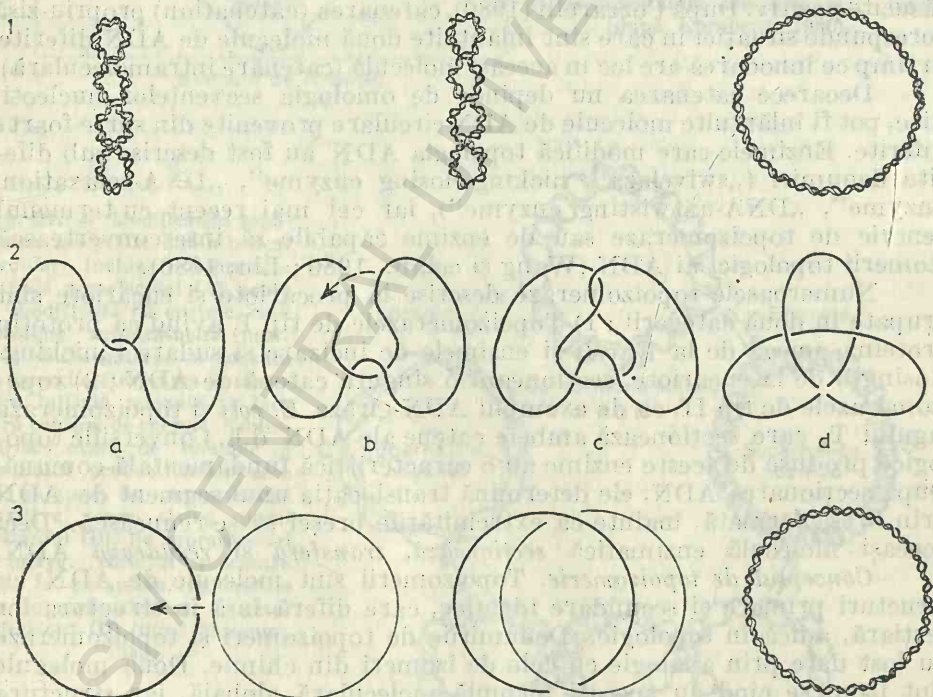


Fig. 22. — Modificările topologice induse de topoizomeraza I de la *E. coli* (după Wang, 1982).

1. Incizia unei catene pune o moleculă de ADN superhelică în stare relaxată. 2. Incizia unei molecule de ADN m.c. circular, la nivelul unei bucle, urmată de trecerea celeilalte bucle prin deschizătură și sudarea catenei incizate determină „innodarea” moleculei (b, c). Moleculele 2c și 2d sînt topologie echivalente, fiecare formă topologică putînd fi obținută din cealaltă, fără secționarea catenei. 3. Topoizomeraza I poate cupla două molecule circulare monocatenare. Dacă conțin secvențe de baze complementare se obține o moleculă de ADN d.h. Procesul necesită incizia unei catene, trecerea celeilalte prin breșa creată, urmată de sudare.

1) Relaxarea moleculelor de ADN d.c. circulare superhelicale prin secționarea unei catene. Acțiunea se manifestă mai ușor asupra moleculelor suprarăsucite negativ, decât asupra celor cu superspiralizare pozitivă.

2) Ele pot determina formarea de noduri în moleculele de ADN m.c. circulare, făcând să traverseze, într-un anumit punct al catenei, o altă regiune a aceleiași catene. Pentru a realiza această conversie, topoizomerazele de tip I trebuie să apropie cele două bucle, să secționeze una din ele și să o transfere pe cealaltă prin breșă. Când breșa este închisă, cerceu se comportă ca un nod. Configurațiile 2c și 2d din fig. 22 sint echivalente, deoarece există posibilitatea trecerii de la una la alta fără secționarea catenei. Topoizomerazele au și posibilitatea de a efectua operația inversă, de a desface un nod astfel produs, realizând relaxarea moleculei.

3) Topoizomerazele de tip I pot înlănțui două molecule de ADN m.c. circulare închise, pentru a forma un catenan. Dacă cele două molecule au secvențe de baze complementare, înlănțuirea poate duce la formarea unei molecule dublu helicale superspiralizată, exceptînd cazul în care numărul înlănțuirilor este egal cu numărul total al perechilor de baze împărțit la 10,5.

După cum remarcă Wang (1982), deși mecanismele de realizare ale acestor configurații topologice sint aparent diferite, în realitate, toate, se realizează prin același mecanism : secționarea unei catene și trecerea unui segment al moleculei prin breșa creată, urmată de închiderea acesteia.

Topoizomerazele de tip II. ADN-giraza. Este o topoizomerază de tip II, izolată și caracterizată de Nash, Gellert și colab. (1977). ADN-giraza *E. coli* este o moleculă tetrameră (~ 400 000 dal), formată din două perechi de subunități identice, A și B. Ea este singura enzimă capabilă să inducă procese de suprarăsucire negativă în structura moleculelor de ADN circulare închise relaxate, utilizînd drept cofactor ATP. Ea poate, de asemenea, să determine printr-o reacție cu evoluție lentă, în absența ATP, relaxarea unei molecule circulare suprarăsucită negativ. ADN-giraza și topoizomerazele de tip II, în general, pot forma și desface noduri ale unor molecule de ADN d.c. circulare, așa cum fac topoizomerazele de tip I cu moleculele de ADN m.c. De asemenea, ele pot catena prin înlănțuirea (cuplarea) a două molecule de ADN d.c. circulare și pot desface moleculele de catenani astfel formate (fig. 23).

Aceste procese se realizează prin secționarea celor două catene, urmată de „trecerea” unui segment al moleculei prin breșa creată înainte de resudarea extremităților produse. După unii cercetători, ar exista și posibilitatea unei acțiuni în doi timpi, prin secționarea unei catene și resudarea ei, înainte de a o înciza pe cea de-a doua. Au fost propuse două modele moleculare de acțiune :

1) ADN-giraza ar acționa fixîndu-se pe un segment lung de ~ 150 pb al moleculei de ADN d.c. circular, care s-ar înfășura dextrogrîr în jurul ei. După aceea, molecula de ADN ar fi secționată prin ruperea unei legături covalente între o grupare glucidică și una fosfat în fiecare catenă, urmată de translocația unui alt segment de ADN prin breșa formată. Cînd se resudează extremitățile secționate, numărul de înlănțuiri este modificat cu două unități, ADN superhelical negativ, avînd deci un deficit net de tururi de helice prin repetarea acestui proces (fig. 24).

2) După alți cercetători, ar exista al doilea mecanism de acțiune a ADN-girazei, care face ca această enzimă să aibă o funcție de barieră moleculară față de translocția unui segment de ADN prin breșe, necesară

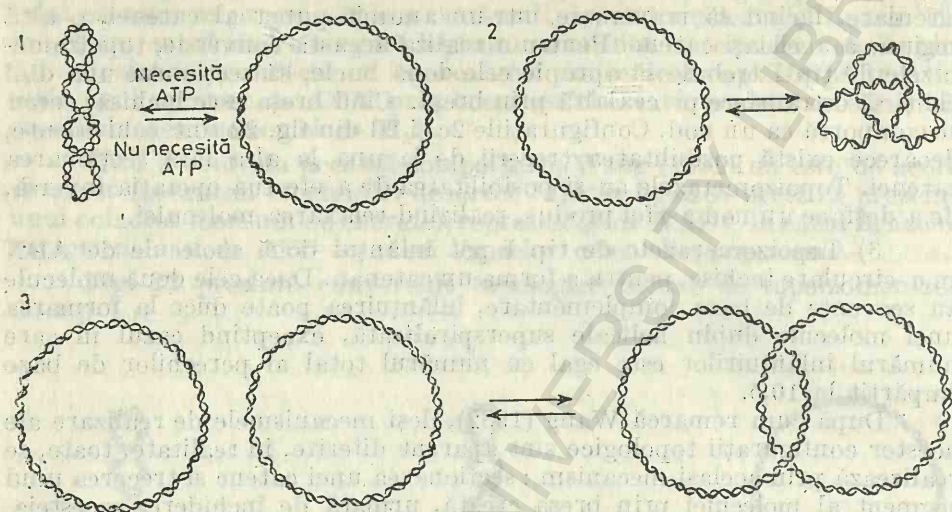


Fig. 23. — Topoizomeraza de tip II (ADN-giraza) de la *E. coli* produce în prezența ATP o suprarăsucire negativă a ADN d.c. circular închis relaxat (1) și poate relaxa suprahelicea negativă în absența ATP, într-o reacție care se produce lent. Ea poate innoda și desnoda moleculele circulare dublu helicale (2). ADN-giraza poate, de asemenea, înălțui două molecule circulare și le poate separa după înălțuire (3) (după Bauer, Crick și White, 1980).

pentru producerea diferitelor modificări topologice. În conformitate cu acest model, procesul ar începe de asemenea prin „înfășurarea” dextrorsă

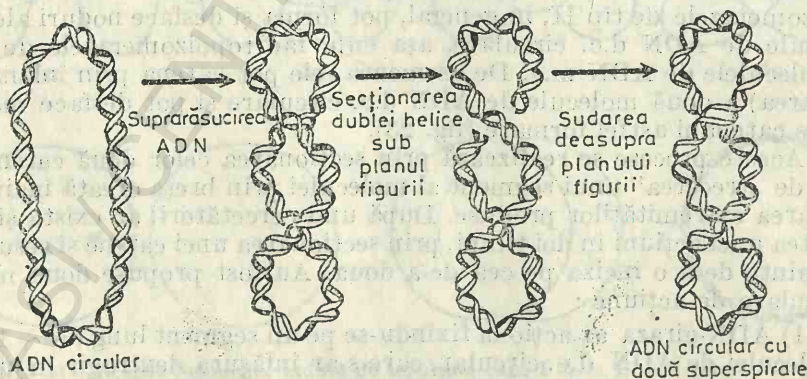


Fig. 24. — Modelul ipotetic de acțiune a ADN-girazei asupra ADN d.c. circular, prin care sînt compensate suprarăsucirile ce apar în cursul replicării și al transcrierii (după Hélène, 1984).

a enzimei de cîte un segment de ADN lung de ~ 150 pb. În faza următoare, cele două subunități A, care formează suprafața enzimei, aflate în contact

cu regiunea mediană a segmentului de ADN legat, s-ar îndepărta una de alta, rupind molecula de ADN circular. Un segment al acesteia ar trece vertical între cele două subunități A ale enzimei, care acționează ca o barieră de intrare. După pătrunderea ADN în structura enzimei aceasta sudează extremitățile rupte anterior, după care cele două subunități A se apropie una de alta închizând „bariera” de intrare. Imediat după închiderea acesteia, subunitățile B, care formează bariere de ieșire, se îndepărtează și segmentul vertical al ADN părăsește enzima.

Rolul modificărilor topologice ale ADN

Deși rolul exact al structurilor suprahelicale și al enzimelor care le modifică nu este precis determinat, există unanimitate în a considera că ele influențează un mare număr de procese celulare. După Gragerov și Mirkin (1980), precum și după Wang (1980, 1982), virtual, toate proprietățile fizice, chimice și biologice ale ADN sînt influențate *in vivo* de circularitatea structurii sale și de deformările asociate cu structura superhelică. Pentru a funcționa, ADN trebuie să suporte cu ușurință transformări conformaționale. Acest proces este favorizat de structura sa superhelică negativă, caracteristică modului de prezentare în celulele vii, precum și de interacțiunea cu numeroase proteine celulare, care stabilizează, destabilizează sau derulează structura terțiară a ADN și, în primul rînd, cu acțiunea topoizomerazelor. Replicarea, transcrierea și recombinația nu pot avea loc decît dacă diferitele enzime au acces la bazele azotate situate în interiorul duplexului de ADN. Or, este evident că numai anumite configurații topologice permit acest acces (Cozzarelli, 1980; Wang, 1982).

Numeroase fapte experimentale pledează în acest sens. Astfel, fagii T4 care codifică o topoizomerază nefuncțională au replicarea mult întîrziată. Fagii lambda lipsiți de integrază sînt incapabili de recombinație cu cromosomul bacterian. Blocarea activității girazei *in vivo*, cu novobiocină sau cu alte antibiotice specifice, determină încetarea sintezei replicative a ADN, inhibarea transcrierii unor operoni, cum este operonul *lac* (ceea ce sugerează și participarea în unele procese de reglare), precum și inhibarea unor procese reparatorii (Avitabile și colab., 1981; Hélène, 1984). Aceste date scot în evidență rolul primordial al ADN-girazei în menținerea structurii ADN în celulă, într-o stare de superspiralizare negativă.

Deși cele mai multe date provin de la bacterii și fagi, răspîndirea universală a topoizomerazelor în celulele eucariote pledează pentru un rol important în general, în manifestarea diferitelor funcții ale materialului genetic (Wang, 1982). Acțiunea asociată a topoizomerazelor controlează configurația topologică intracelulară a ADN și în primul rînd gradul de superspiralizare. În timp ce ADN-girazele determină suprarăsucire, topoizomerazele de tip I îl relaxează în gradul dorit. Acțiunea lor corelată determină o stare de echilibru necesară, pentru că atît replicarea, cît și transcrierea ADN necesită separarea catenelor ADN.

Rolul topoizomerazelor în replicarea ADN. În primul rând, superspiralarea negativă realizată de ADN-giraze facilitează detorsadarea celor două catene ale unei molecule de ADN circulare dublu helicale, necesară pentru a expune bazele din mijlocul duplexului helical la acțiunea enzimelor. Acționând ca pivot („swivel”), această enzimă ține molecula de ADN care se replică în mod continuu în stare superhelică negativă, favorizând separarea locală a catenelor, necesară pentru formarea bifurcației de replicare (Gellert și colab., 1979). De asemenea, ADN-giraza menține intermediarii de replicare sub „tensiune negativă”, favorabilă deschiderii celor două catene. Cea de-a doua acțiune absolut esențială pentru replicare constă în îndepărtarea stării superhelicale indusă în cursul replicării ADN d.c. circular de înaintarea bifurcației de replicare (fig. 25).



Fig. 25. — Modificările topologice ale ADN d.c. în cursul replicării. 1. La bacterii, ADN-giraza suprarăsucește negativ ADN circular. 2. Dezrăsucirea necesară, probabil, pentru inițierea replicării se realizează mai ușor în cazul moleculelor suprarăsucite negativ. 3. Asamblarea noilor catene începe la nivelul catenelor parentale folosite ca matriță. 4. Replicarea continuă pe măsură ce dubla helice se dezrăsucește progresiv sub acțiunea unei (sau mai multe) molecule de topoizomeraze, care reduc repetat numărul de înlănțuiri. Final, numărul de înlănțuiri trebuie să fie egal cu zero, astfel încât cele două molecule progene, formate fiecare dintr-o catenă veche și una nou sintetizată, să se poată replica (după Hélène, 1984).

Rolul topoizomerazelor în transcrierea ADN → ARN. Ca și replicarea, transcrierea genetică necesită „deschiderea” inițială a cel puțin 10 pb, pentru legarea ARN-polimerazei de ADN. Acest proces este influențat de fixarea altor proteine pe situsurile vecine, care depinde la rândul său de gradul diferit de suprarăsucire. Experimental s-a demonstrat că *in vitro* ADN în stare superhelică negativă este o matriță mai eficientă pentru transcrierea la ARNm decât moleculele relaxate. De aceea, ajustarea gradului de superspiralizare în celulă poate contribui la reglarea vitezei de transcriere a unor operoni. În acest fel, el ar putea juca un rol regulator în transcrierea genetică, de care depinde în mare măsură intensitatea metabolismului celular.

Rolul topoizomerazelor în recombinarea genetică. Procesul de recombinaere genetică necesită de asemenea „deschiderea” și resudarea catenelor ADN d.h. Rolul topoizomerazelor a fost evidențiat prima dată în integrarea fagului λ la *E. coli*. Integraza — care este o topoizomerază secționează ADN d.c. bacterian și viral, facilitând integrarea celui de-al doilea ca profag. Ea relaxează ADN superhelical negativ și favorizează formarea unei legături covalente între catenele secționate. În sfârșit, după Cozzarelli (1980), capacitatea topoizomerazelor de a modifica topologia ADN ar putea fi deosebit de importantă în aranjarea compactă a cromosomului în celulă, ea și în modificările poziției acestuia în compartimentul celular atât de limitat în cursul diferitelor sale activități.

Genomul bacterian

(Pl. 6—8)

Genomul bacterian este alcătuit din două categorii de determinanți genetici : genele esențiale (eucromosomale), localizate în structura cromosomului bacterian, și genele accesorii, prezente în structura plasmidelor, a elementelor genetice transpozabile (SI și Tn) și a unor fagi (Campbell, 1981). Cromosomul bacterian poartă deci în structura sa toată informația genetică necesară pentru existența unei celule bacteriene, respectiv setul de determinanți genetici care reprezintă, teoretic, acel minimum necesar pentru a codifica arhitectura celulei bacteriene, precum și poziția sa ecologică, normală, genele menite să asigure metabolismul energetic și de biosinteză, creșterea și diviziunea și, în același timp, reglarea diferitelor activități celulare.

Elementele genetice extracromosomale poartă în structura lor informația genetică accesorie (neesențială), „de confort”, care permite celulei bacteriene o mai bună adaptare, în general, la condiții de mediu noi sau modificate.

Cromosomul bacterian

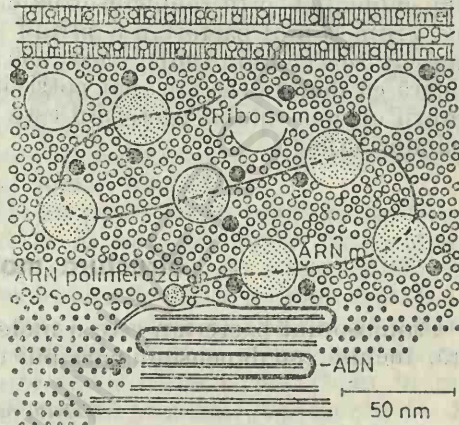
Cromosomul bacterian este alcătuit dintr-o moleculă de ADN dublu helicală circulară închisă covalent (structură notată convențional CCC (după engl. „circular covalent closed”). La *E. coli*, la care conține $4,1 \times 10^6$ perechi de baze nucleotidice, are un diametru de 2,5 nm, o lungime de $\sim 1\,360\ \mu\text{m}$ și o masă moleculară de $\sim 2,5 \pm 0,3 \times 10^9$ dal. Inclavat direct în citoplasmă (fig. 26), formează structura cunoscută, datorită caracterelor sale particulare sub diferite denumiri ca *nucleoid*, *nucleosom*, *nucleoplasmă*, *material nuclear* sau *nucleu de tip procariot* (lipsit de membrană nucleară). El ocupă o regiune limitată, în general centrală în celula bacteriană, cu aspect mai clar pe microelectronografii, plină de fibrile fine, paralele, ondulate, cu \varnothing de 2,0—5,0 nm, care dispar după digestia cu dezoxiribonuclează.

Mărimea și forma

Mărimea și forma nucleului bacterian variază foarte mult, în funcție de natura mediului de cultură și a condițiilor de mediu. Ryter și Chang (1975) au arătat că la *E. coli* cultivată pe medii bogate în nutrienți, „suprafețele” aparente ale nucleoidului (sau nucleozilor) sînt mult mai neregulate

și întortochiaste decât cele aparținând celulelor care cresc lent, pe medii minimale. Variațiile de formă ale nucleoidului țin probabil de starea dinamică a organizării ADN *in vivo* (Giorno și colab., 1975) care, la rîndul său este dependentă de starea fiziologică a celulei. Aspectul de entități nucleare

Fig. 26. — Reprezentarea schematică a unei regiuni de 200 nm² din *E. coli*, mărită de un milion de ori. Cercul mari = ribosomi cu \varnothing de 25 nm. Distanța dintre ei pe molecula de ARNm este de 60 nm (150 de nucleotide). Cercul mici = proteine cu dimensiuni medii (\varnothing 4,6 nm) situate la distanțe de 1,5 nm. Cercul mari negre reprezintă una din proteinele cele mai abundente EF-TU. Fibrilele de ADN nud (\varnothing 2,2 nm) sînt prezentate în secțiune transversală și sub formă de catene paralele, cu o distanță interhelicală de 3,2 nm. Fibrila de ADN are *in vivo* lungimea de 960 pb care codifică o proteină medie (\sim 40 kdal). Gena este transcrisă de ARN polimerază (\varnothing 10,2 nm). Sînt prezentați șase ribosomi activi, dispuși pe o moleculă de ARNm complet extinsă (382 nm). Transcrierea genei durează 16 secunde, iar traducerea ei, 32 secunde. Membrana celulară conține proteine cu g.m. 40 kdal (după Woldringh și Nanninga, 1985).



separate în aceeași celulă este, după Hecht și colab. (1975), numai aparent, deoarece nucleozii „multipli” sînt în realitate interconectați. Nu se știe în prezent dacă legătura dintre ei este datorită segregării incomplete, prezenței unor resturi de membrane celulare sau eventual unor structuri specializate. Dovada existenței unei legături între nucleozii aparent separați este furnizată și de studiul lui Pettijohn și Carlson (1979), care au demonstrat că conținutul mediu în ADN per nucleoid izolat este foarte asemănător cu conținutul per celulă, atît în cazul nucleozilor unici, cît și în cazul celor proveniți din celule „cu mai mulți nucleozii”.

Pornind de la observațiile care pledează pentru o structură dinamică a materialului genetic la bacterii, Ryter și Cohen (1975) consideră că nucleoidul evidențiat la microscopul electronic ca o structură netă intra-celulară ar reprezenta fracțiunea de ADN condensat, genetic inactivă. Secvențele de ADN care conțin genele transcrise activ ar forma probabil bucle, externe față de nucleoid, în citoplasmă, unde ar fi mai ușor accesibile ADN polimerazei și ribosomilor. Întrucît la procariote, transcrierea informației genetice este cuplată totdeauna cu traducerea, formarea de bucle intracitoplasmice de către genele active ar evita necesitatea ca ribosomii să funcționeze în structura compact împachetată a nucleoidului. Deoarece buclele de ADN nu se văd pe secțiuni ultrafine din cauză diame-

trului lor mic și a fondului dens al citoplasmei, Ryter și Cohen (1975) au urmărit distribuția intracelulară a ADN, în raport cu suprafața nucleoidului, printr-o metodă radioautografică de mare rezoluție. În acest fel, s-a demonstrat că în celulele care cresc rapid (în care genele sint transerise mai activ), granulațiile autoradiografice provenite de la ADN marcat cu timidină tritiată se găsesse într-o proporție mult mai mare la distanță (extern) față de nucleoid în comparație cu celulele care cresc lent. Aceste date permit concluzia că porțiunile genetice active *in vivo* ale cromosomului s-ar găsi sub formă de bucle citoplasmice de ADN, situate în afara nucleului evidențiat prin tehnicile uzuale. Datorită caracterelor sale particulare, cromosomul bacterian a primit diferite denumiri ca, de exemplu, aceea de *lineom* (Kühn, 1961), *nucleosom* (Colobert, 1967) etc. Birge (1981) consideră că denumirea cea mai potrivită pentru a caracteriza unicitatea structurii cromosomului bacterian este aceea de *genofer*, propusă de Ris și Chandler (1963).

Structura moleculară

Cromosomul bacterian este o moleculă de ADN dublu catenară circulară, închisă, cu dimensiuni variabile de la o specie la alta (tabelul nr. 7).

Tabelul nr. 7

Mărimea genomului bacterian comparativ cu aceea a unor microfungi

Microorganismul	Greutatea moleculară în daltoni	Nr. perechilor de nucleotide per nucleoid	Nr. calculat al cistronilor*	Sursa de informație
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	$0,2 \times 10^9$	$0,3 \times 10^6$	~ 300	Morowitz și colab. (1962)
<i>Haemophilus influenzae</i>	$0,72 \times 10^9$	$1,2 \times 10^6$	~ 1 200	Berns și Thomas (1965)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	$1,2 \times 10^9$	$1,9 \times 10^6$	~ 1 900	Caldwell și Hinshelwood (1950)
<i>Pseudomonas campestri</i>	$(2,1 \pm 0,3) \times 10^9$	$3,4 \times 10^6$	~ 3 400	Park și De Ley (1967)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$(2,5 \pm 0,7) \times 10^9$	$4,0 \times 10^6$	~ 4 000	Park și De Ley (1967)
<i>Pseudomonas putida</i>	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^9$	$4,4 \times 10^6$	~ 4 400	Park și De Ley (1967)
<i>Bacillus subtilis</i>	$2,4 \times 10^9$	$3,9 \times 10^6$	~ 3 900	De Ley și Park (1970)
<i>Escherichia coli</i>	$2,8 \times 10^9$	$4,5 \times 10^6$	~ 4 500	Cairns (1963)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43×10^9	70×10^6	~ 70 000	Ogur, Minkler și McClary (1953)
<i>Neurospora crassa</i>	26×10^9	43×10^6	~ 43 000	Horowitz și MacLeod (1960)
<i>Aspergillus nidulans</i>	25×10^9	41×10^6	~ 41 000	Pontecorvo și Roper (1956)

* Numărul cistronilor a fost calculat, presupunând 1 000 pb/per cistron. Datele referitoare la fungi sint date pentru comparație.

Structura circulară este caracteristică nu numai cromosomului bacterian, ci și altor molecule de ADN prezente în celulele procariote, cum sunt plasmidele F, R sau Col. Genomul fagilor este fie circular, fie linear, însă capabil de circularizare după infectarea celulei bacteriene, de regulă prin reunirea unor extremități coezive (sau adezive).

Avantajele structurii circulare nu sunt cunoscute. Este probabil că acest tip de structură asigură protecția moleculei de ADN față de degradarea enzimatică prin exonucleaze, care acționează asupra extremităților libere ale moleculei. Ea poate contribui la reglarea procesului de replicare deoarece, după Pettijohn și Carlson (1976), replicarea ultimelor nucleotide dintr-o secvență necesită probabil prezența altor nucleotide dincolo de secvența respectivă, pentru a asigura structura circulară. În sfârșit, structura circulară a moleculei d.h. creează o anumită constrângere topologică și prin aceasta condiția necesară pentru ca molecula să sufere un proces de suprarăsucire, care asigură împachetarea cromosomului într-un spațiu strict limitat cum este cel al celulei bacteriene.

Stonington și Pettijohn (1971) au perfecționat tehnicile de izolare a nucleoidului, care poate fi separat la *E. coli* sub forma unui corpuscul dens, compact, având constanta de sedimentare de 1 600—2 200 S, în funcție de stadiul de replicare a moleculei de ADN cromosomal. S-a demonstrat că din punct de vedere chimic nucleoidul este un complex ADN —

ARN—proteine, în care ADN reprezintă ~80% și corespunde cromosomului bacterian, într-o conformație asemănătoare, cel puțin în mare, stării în care se găsește *in vivo*. Componenta proteică, reprezentând ~10% din greutatea nucleoidului (sub 1% din proteina celulară totală), este în cea mai mare parte formată din subunitățile α , β și β' ale ARN-polimerazei (Worcel și Burgi, 1972). ARN care reprezintă, de asemenea ~10% din nucleoid este format din ARNr și ARNm în curs de formare. Complexul este foarte sensibil la acțiunea ribonucleazei. După tratare cu această enzimă, cromosomul bacterian se eliberează sub forma unei molecule de ADN dublu helicală, ceea ce demonstrează că ARN are rolul de a stabiliza și menține forma condensată (compactă) a nucleului.

Ipoteze privind modul de „împachetare” a cromosomului bacterian

În prezent nu se cunoaște exact mecanismul molecular prin care cromosomul bacterian, mai lung de 400—1 000 de ori decât dimensiunea lineară a celulei bacteriene este „împachetat” într-un volum atât de mic, cum este cel al nucleoidului respectiv al celulei bacteriene. Dacă „împachetarea” s-ar face la întâmplare, s-ar produce inevitabil „încurcarea” moleculei de ADN, o parte din informația genetică ar fi prinsă în zonele mai ascunse și ar deveni inaccesibilă pentru transcrierea genetică, atunci când este nevoie. Încă din anul 1966, Maaløe și Kjeldgaard, bazându-se pe structura constant limitată la un volum mic din celulă, fără să se răspîndească în citoplasmă, a ADN bacterian și pe faptul că informația genetică este totdeauna accesibilă sistemelor de transcriere și traducere genetică, au emis ipoteza unei mențineri a fibrilelor de ADN învecinate, într-o

structură organizată, prin intermediul poliaminelor, care ar forma legături tranzitorii cu ADN. Problema modului de împachetare a cromosomului bacterian este deosebit de importantă pentru biologia bacteriană, deoarece este strins corelată cu unele funcții esențiale ale materialului genetic, ca replicarea, transcrierea și recombinația.

Fong (1967) a propus un mecanism de „împachetare prin suprarăsucire”. După ipoteza sa, modificările proprietăților dielectrice ale mediului nuclear afectează forțele de atracție intermoleculare dintre perechile de baze și, ca urmare, molecula circulară dublu helicală se răsucește într-o superhelice de gradul I (o dublă helice în care fiecare helice este ea însăși o dublă helice, provenită din molecula inițială). În felul acesta, molecula circulară s-ar transforma într-o structură lineară, a cărei lungime este jumătate din circumferința inițială. Procesul ar continua prin formare de superhelice de gradul 2, 3, 4 ș.a.m.d. O superhelice de gradul 10 ar avea o dimensiune lineară mai mică decât lungimea originară a ADN, de 2^{10} ori (respectiv de 1024 ori), ceea ce corespunde aproximativ dimensiunilor nucleoidului *E. coli*. După Fong, acest proces ar necesita introducerea a ~ 1000 ture de suprarăsucire în ADN, schimbare destul de mică și teoretic posibilă, deoarece ar corespunde la o tură suprahelicală, la fiecare 300—400 ture ale ADN originar.

Ulterior, Pettijohn și Hecht (1974) au elaborat un model de „împachetare” a ADN cromosomal, bazat pe un proces dublu de pliere și formare de superhelice, în care structura condensată a ADN ar fi menținută prin acțiunea asociată a ARN și a proteinelor din nucleoid. Modelul este susținut de următoarele fapte de observație:

1) Nucleoidul se derulează dacă este tratat cu agenți care degradează sau denaturează proteinele, ceea ce arată că acestea sînt esențiale pentru menținerea stabilității cromosomului izolat în stare compactă (Pettijohn 1973, 1979; Drlica și Worcel, 1975).

2) În mod similar, tratarea cu RN-ază sau suprimarea sintezei ARN prin cultivare în medii cu rifampicină duc la apariția unor molecule cromosomale, mai mult sau mai puțin depliate și aproape lipsite de structuri superhelicale detectabile (Hecht și colab., 1977). Deplierea totală are loc cînd fie ARN, fie proteinele nucleoidale sînt complet dissociate de ADN.

3) Din cercetările lui Vinograd (1965) este cunoscut faptul că producerea unei incizii monocatenare („nick”) cu ajutorul DNazei în structura ADN d.h. suprimă constrîngerile rotaționale și, ca urmare, catena secționată se rotește liber în jurul celei intacte, determinînd suprimarea suprarăsucirilor. Or, în cazul nucleoidului de *E. coli* incizia monocatenară elimină bruse constrîngerile și structura suprahelicală numai într-un segment localizat al ADN, ca și cum anumite restricții ar împiedica propagarea rotației catenei secționată în regiunile adiacente. Aceasta demonstrează că ADN cromosomal este împărțit într-o serie de domenii de suprarăsucire, fiecare supus unor constrîngeri topologice separate (fig. 27).

În conformitate cu aceste fapte de observație, modelul lui Pettijohn și Hecht (1973) consideră că moleculele de ARN în curs de formare se leagă de două situsuri separate de pe molecula de ADN cromosomal, împărțind-o într-o serie de domenii de pliere („folding”) și suprarăsucire („supercoiling”). Un domeniu de suprarăsucire este deci reprezentat de o

regiune a ADN d.h., delimitată de cele două situsuri de legare ale ARN. Datorită lor producerea unei incizii monocatenare cu DNază desface superhelicea numai în bucla respectivă, fără a afecta structura superhelică a altor domenii. Degradarea a două molecule de ARN aparținând unor

Planşa nr. 1

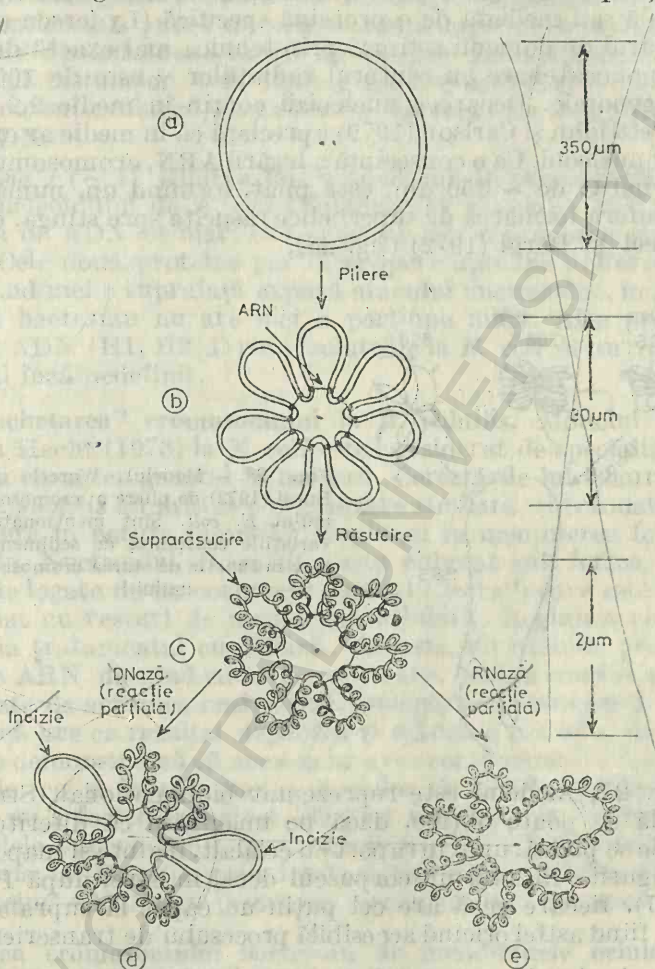


Fig. 27. — Modelul lui Pettijohn (1974) de „impachetare” a cromosomului bacterian. A. Cromosom circular nepliat cu \varnothing 350 μm . B. Cromosom pliat cu 7 bucle. În realitate, ar exista 40–80 domenii de pliere, corespunzând unui \varnothing de 30 μm . C. Cromosom pliat în care buclele au suferit transformare superhelică. Dacă pasul superhelice este de 11 nm, \varnothing nucleului este de 2 μm . Modelul bidimensional devine tridimensional prin plierea zonelor superhelicale deasupra și dedesubtul planului hirtiei. DNaza produce incizii monocatenare și desface superhelicea în bucla respectivă, fără a afecta structura superhelică a altor domenii (D). E. Secționarea a două molecule de ARN ale unor domenii adiacente unește cele două domenii, fără pierderea structurii lor superhelicale.

domenii adiacente cu RNază unește cele două domenii, fără pierderea structurii lor superhelicale (fig. 27). Fiecare moleculă de ARN leagă între ele două regiuni îndepărtate ale dublei helice cromosomale în așa fel încât

o serie de interacțiuni de acest gen separă întregul cromosom într-o serie de domenii succesive de-a lungul lui. ARN în curs de sinteză este legat de extremitatea 3' a ADN prin intermediul unei molecule de ARN-polimerază, celălalt situs de legare putînd fi un hibrid ARN-ADN, o legătură triplu helicală sau mediată de o proteină specifică (Lydersen și Pettijohn, 1977). Numărul de domenii estimat prin tehnica mai exactă de producere de incizii monocatenare cu ajutorul radiațiilor γ este de 100 ± 30 , per echivalent genomic. Deoarece nucleozii conțin în medie 2,2 echivalenți genomici, Pettijohn și Carlson (1979) apreciază că în medie ar exista ~ 200 domenii per nucleoid. Ca o consecință a legării ARN, cromosomul bacterian circular, avînd \varnothing de $\sim 350 \mu\text{m}$, este pliat, formînd un număr de ~ 80 bucle care suferă formarea de superhelice răsucite spre stînga, după modelul lui Worcel și Burgi (1972) (fig. 28).

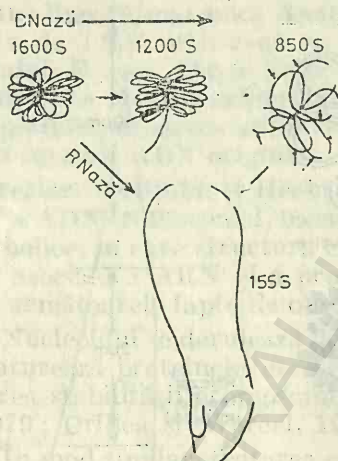


Fig. 28. — Modelul Worcel și Burgi (1972) de pliere a cromosomului *E. coli*. Sînt menționate variațiile constante de sedimentare în funcție de starea cromosomului.

În fig. 27, modelul este reprezentat bidimensional. Structura tridimensională se poate obține, dacă ne imaginăm că diferitele domenii superhelicale se pliază, unul în raport cu celălalt, înainte și înapoi, în raport cu planul figurii. Rezultă un corpuscul dens, în care, după Pettijohn și Hecht (1977), fiecare genă are cel puțin un capăt la suprafața regiunii nucleoidale, fiind astfel oricînd accesibilă procesului de transcriere genetică.

Proteinele de „împachetare” la bacterii. Liza celulelor de *E. coli*, direct pe pelicula suport și examinarea rapidă prin microscopie electronică, i-au permis lui Griffith (1977) să evidențieze ADN cromosomal în stare înalt pliată și complexat cu cantități importante de proteine bazice mici. El apare sub forma unor fibre cu \varnothing de 12 nm și cu o substructură repetată, ca un șirag de mărgel, avînd \varnothing 13 nm. Dintre aceste proteine cele mai studiate sînt următoarele:

Proteina HU (engl. „Helix unwinding”), prezentă sub forma unui multimer al unui polipeptid de ~ 9 Kdal, seamănă cu histonele, fiind bogată în lizină și alanină și lipsită de cisteină și triptofan. După Rouvière-Yaniv (1975) ar exista $\sim 30\,000$ molecule de proteină HD (proteina 2, HD (engl. „Helix destabilizing” sau H) per cromosom la *E. coli*, ceca

ce ar reprezenta un raport de o moleculă la fiecare 150–200 pb în ADN. Proteina HU determină plierea ADN și în cantități suficiente asigură așezarea lui în bucle cu forma unor ghirlande, foarte condensate, avînd aspectul unor mărgele. Proteine cu mărime, compoziție și proprietăți similare, identice din punct de vedere imunologic au fost evidențiate la cianobacterii din genul *Anabaena* și *Aphanocapsa*. Acest fapt demonstrează — ca și în cazul histonelor — un înalt grad de conservare a unor asemenea proteine în cursul evoluției, ea avînd funcții esențiale în stabilizarea conformației ADN.

Proteina I (~ 17 Kdal) a fost evidențiată în preparatele înalt purificate ale nucleoidului de *E. coli* (Vardhavsky și colab., 1977). Raportat la cantitatea de ADN celular, ea se găsește într-o proporție similară proteinei HU. Cele două proteine par să acopere aproape uniform fibrele de ADN, nelăsînd nici o suprafață expusă atacului nucleazelor, în așa fel încît cromosomul bacterian nu are nici o porțiune nudă. Alte proteine mici de legare cu ADN (H1, H2, D etc.) izolate de la *E. coli* au un rol structural și funcțional încă nedefinit.

„Împachetarea” cromosomului la *B. subtilis*. Modelul descris de Pettijohn și Hecht (1973) la *E. coli* este considerat de specialiști ca avînd potențial un caracter general la bacterii. Cercetările lui Charret și colab. (1980) la *B. subtilis* au arătat o organizare similară, și totodată existența unor diferențe în natura factorilor implicați în menținerea formei pliate superhelicale. Nucleoidul *B. subtilis* este eliberat sub forma unor bucle superhelicale legate de un corpusecul central („core”) care este format din ADN, asociat cu resturi de membrană celulară. Regiunea centrală este insensibilă la tratamentul cu RNază. Aceasta nu exclude prezența unor molecule de ARN născînd ca la *E. coli*, care, pentru motive neelucidate, ar fi protejate de acțiunea enzimatică. Îndepărtarea completă a resturilor de membrană are ca rezultat depierea și scăderea gradului de suprarăsucire, ceea ce demonstrează că acestea ar avea rol în separarea „domeniilor” cromosomale, ca și în menținerea buclelor de ADN superhelicale. Deși acest lucru nu a fost demonstrat, Charret și colab., presupun că și la *B. subtilis* buclele superhelicale ar fi stabilizate de ARN (eventual diferit de cel descris la *E. coli*), prin interacțiuni ARN—ARN, ARN—ADN, ARN—proteine—ADN sau printr-un mecanism încă necunoscut.

Legarea cromosomului bacterian de membranele celulare. Ryter și Jacob (1963, 1964) au arătat pe microelectronografii în serie existența unei legături între nucleoid și mezosomi, elaborînd în același timp un model menit să explice mecanismul segregării cromosomului în celulele nou formate. Replicarea cromosomilor s-ar face atașați de mezosomi, care suferă și ei un proces de dedublare. Mezosomii rezultați din acest proces se îndepărtează progresiv unul de altul, antrenînd fiecare cromosomul legat de el, grație sintezei de membrană citoplasmatică prin care se creează septul transversal de diviziune (fig. 111).

Rezultate similare au fost obținute de Van Iterson și Green (1971). Legătura dintre mezosom și cromosom pare să fie deosebit de puternică, deoarece în cursul plasmolizei mezosomul progresiv devaginat sub acțiunea forțelor osmotice, trage după el cromosomul, care ajunge astfel alipit

direct de membrana plasmatică. Ei pledează însă pentru existența mai multor puncte de contact intim între fibrilele de ADN și veziculele mezosomale.

Datele privind legătura dintre cromosomul bacterian și mezosom sînt discutabile, în măsura în care cercetările lui Nanninga (1984) vor fi confirmate. El consideră că mezosomii, adevărate „structuri în căutarea unei funcții” (Murray, 1965), sînt artefacte care apar în cursul preparării pentru examenul microelectronoptic. În acest sens, a elaborat un model de formare a mezosomilor prin alterare chimică (fixare cu tetraoxid de osmiu) sau fizică (în special, modificări de presiune osmotică). Pătrunderea mezosomilor în nucleoplasmă și „legarea” de cromosom s-ar datora rezistenței fizice mai mici a acestora, comparativ cu cea a citoplasmei (Nanninga, 1985).

Un argument în sprijinul legăturii dintre cromosom și membranele celulare este faptul că frecvent, ADN cromosomal este izolat numai asociat cu 1–2 „petice” de membrane celulare (Delius și Worcel, 1979). „Peticele” membranare au multe găuri, produse probabil de tratamentul cu lizozim, și sînt înconjurate de spirale de ADN și segmente superhelicale plectonemice, mai abundente. La marginea complexului, unde etalarea moleculei este mai extensivă, Worcel și Burgi (1979), precum și Pettijohn și Carlson (1979) au demonstrat prezența în lizatele de *E. coli* a două tipuri de cromosomi bacterieni și anume pliați, liberi și respectiv legați de membrana celulară. Ei conțin aceeași cantitate de ADN, dar prezintă o serie de deosebiri, dintre care cea mai semnificativă este prezența de fosfolipide și de proteine, care provin probabil din membrana externă a peretelui celular. Două proteine specifice ale membranelor celulare avînd ~ 50 000 dal și respectiv 80 000 dal par să fie în special legate de ADN bacterian (Worcel și Portalier, 1976).

Pornind de la observația că în mod constant din celulele *E. coli* se pot elibera atît cromosomi liberi, cît și cromosomi legați de membrane, Worcel și Burgi (1974) consideră că *in vivo* cromosomii aflați în stare de repaus ar fi nelegați de membrane sau legați atît de slab încît în cursul operațiilor de liză s-ar desprinde de aceasta, chiar la temperaturi scăzute. Legarea cromosomului de membrană ar fi evenimentul care reglează inițierea replicării ADN cromosomal. Este posibil ca proteina (sau proteinele)-inițiator a replicării, a căror sinteză este necesară pentru inițierea unui nou ciclu de replicare să fie implicate atît în inițiere, cît și în legarea cromosomului de membrană, așa cum a postulat inițial Jacob (1963). Leibowitz și Schaechter (1975) au confirmat existența unor situații de legare a cromosomilor de învelișurile celulare, răspunzătoare de asemenea de segregarea cromosomilor-fii în cursul diviziunii. Ele ar putea corespunde replisomilor (Bleecken, 1971) la nivelul cărora începe replicarea.

Structura genetică a bacteriilor

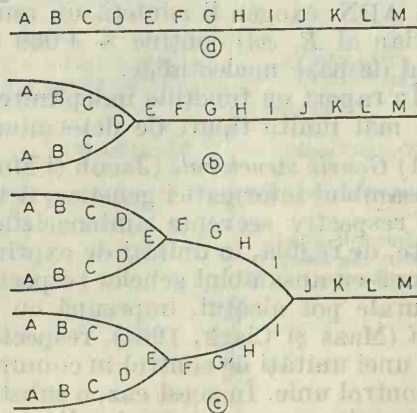
După Birge (1981) : „deoarece celulele bacteriene sînt lipsite de capacitatea de a face mitoză, ele trebuie să fie, cu necesitate, haploide” *. După cum este știut, în cazul organismelor eucariote, procesul de mitoză face

* Există și excepții de la această afirmație, de exemplu fungii care, deși au o structură genetică haploidă, se divid mitotic.

ca la sfârșitul fiecărei diviziuni, fiecare celulă-fiică să posede setul corespunzător de cromosomi (în cazul unei celule diploide două copii din fiecare tip de cromosom). Starea de haploidie, implică, în sens strict genetic, prezența în fiecare celulă a unei singure copii din fiecare structură purtătoare de informație genetică, respectiv din fiecare cromosom. Aplicat la bacterii, acest concept ar corespunde prezenței unui singur cromosom per celulă, exceptând perioada premergătoare diviziunii celulare, când înainte de separare fiecare celulă conține doi cromosomi.

Or, studiile experimentale au demonstrat că înțelegerea stării de haploidie a bacteriilor este complicată datorită unor particularități care nu se întâlnesc la alte organisme. Astfel, numeroase observații au scos în evidență faptul că, conținutul în ADN per nucleoid variază în diferitele celule, ale aceleiași bacterii, când cresc cu viteze diferite. De asemenea, observațiile furnizate de autoradiografii, ca și de microscopia electronică au arătat că în celulele care cresc nesincronizat ADN din nucleozii este evidențiat în diferite stadii de replicare parțială (Pettijohn și Carlson, 1979). Aceste situații sînt datorate faptului că foarte frecvent, în special în medii de cultură bogate în nutrienți, unele celule bacteriene cresc cu o viteză mare. În aceste condiții, timpul de generație (respectiv intervalul de timp între două diviziuni succesive) este mult mai scurt decît timpul necesar pentru replicarea moleculei de ADN cromosomal. Celula bacteriană încearcă să compenseze această situație, prin inițierea unui al doilea ciclu de replicare, înainte ca cel anterior să se fi terminat. Deci, dacă timpul de generație scade, scade și intervalul de timp necesar pentru inițierea unui nou ciclu de replicare și, ca urmare, numărul de bifurcații de replicare a ADN cromosomal crește. Ca urmare, celulele bacteriene care cresc rapid pot conține mai multe copii de informație genetică. Situa-

Fig. 29. — Efectele replicării asupra cromosomului bacterian și „dozării” genelor. a. ADN d.c. nereplicat; b. Inițierea primei runde de replicare la extremitatea stîngă a moleculei. c. Inițierea celei de-a doua runde are loc înainte ca prima să fie terminată, producînd două noi bifurcații de replicare. Același efect se produce și pe cromosomul circular (după Birge, 1981).



ția este complicată de faptul că datorită mecanismului descris, informația genetică, localizată în apropierea situsului de origine a replicării, se poate găsi în cantități mai mari decît cea localizată aproape de situsul terminus al replicării (fig. 29).

Datorită acestei situații, după Birge (1981), nu se poate pune problema numărului de genomuri pe celulă (respectiv numărul de seturi de informație/celulă), deoarece cele mai multe sînt incomplet replicate. De aceea, este preferabil să se utilizeze termenul de *echivalent genomic* („genome equivalent”), care se referă la numărul de perechi de baze nucleotidice conținute într-un genom bacterian complet (nucleoid). Un studiu detaliat al lui Kubitschek și Freedman (1981) a arătat că bacteriile cultivate în medii bogate în nutrienți conțin între 1 și peste 5 echivalenți genomici per celulă. Această situație s-ar datora atât conținutului mai mare în ADN per nucleoid, cit și faptului că — cel puțin aparent — celulele care cresc rapid conțin frecvent mai mult decît un nucleoid.

Nu se știe dacă nucleozii multipli care apar fizic independenți sînt realmente liberi sau sînt legați prin interconexiuni înainte de separare. Ținînd seama de aceste particularități, Birge (1981) se raliază punctului de vedere al autorilor care consideră celula bacteriană ca haploidă, deși conține mai mulți echivalenți genomici de ADN „deoarece tot ADN este identic, pentru că descinde din aceeași moleculă originară”. Situația este similară cu aceea a celulelor diploide eucariote, exact înainte de diviziune, care conțin patru copii din fiecare tip de cromosom în loc de două și sînt încă considerate ca diploide (Birge, 1981). O situație specială este întîlnită în cazul bacteriilor care au primit un segment de ADN exogen, străin, pe calea unui transfer de material genetic. În acest caz, celula conține practic două seturi de informație genetică diferite. Întrucît, de regulă, prin transfer se transmite numai un fragment din genomul donatorului, celula bacteriană receptoare este *parțial diploidă* sau *merodiploidă*.

Dacă fragmentul de ADN este capabil de replicare autonomă, starea merodiploidă poate persista indefinit. În caz contrar, dacă nu este integrat prin recombinare genetică, celula diploidă se pierde în populația dominantă cantitativ de celule haploide, exceptînd cazul în care fragmentul de ADN exogen îi conferă un anumit avantaj selectiv. Cromosomul bacterian al *E. coli* conține ~ 4 000 de gene, fiecare avînd ~ 1 000 de perechi de baze nucleotidice.

În raport cu funcțiile îndeplinite, în structura cromosomului se pot întîlni mai multe tipuri de determinanți genetici:

1) *Genele structurale* (Jacob și Monod, 1959), care reprezintă ~ 90 % din ansamblul informației genetice, determină structura primară a proteinelor, respectiv secvența aminoacizilor în lanțul polipeptidic. Ele sînt grupate, de regulă, în unități de exprimare coordonată — numite *operoni*, împreună cu ansamblul genelor respective de reglare. Mult mai rar, genele structurale pot alcătui, împreună cu genele de reglare corespunzătoare, *regloni* (Maas și Clark, 1964), respectiv sisteme speciale de reglare, sub forma unei unități de control în comun a unor gene dispersate, dar supuse unui control unic. În acest caz, o substanță represor unică interacționează cu mai multe gene operator implicate în exprimarea fiecărei gene individuale sau a fiecărui grup de gene.

2) *Genele de reglare* au funcția de a controla activitatea genelor structurale, prin intermediul produsului lor (*represor* sau *aporepresor*).

3) *Regiunile operator* reprezintă segmentul de ADN cromosomal din structura fiecărui operon care acționează ca receptor de semnale. Ele

înregistrează prezența substanțelor cu funcție de represor sau de inductor în mediu și asigură funcționarea coordonată a operonului.

4) Regiunea *promotor* (inițiator) reprezintă un sector din structura operonului, situat adiacent genei operator. El are funcția de inițiere a transcrierii genetice a operonului respectiv, în molecule de ARNm. La nivelul său are loc legarea enzimei efectorare, ARN-polimeraza.

5) *Secvențele de inserție* (notate convențional SI) sînt secvențe nucleotidice scurte ($\sim 800 - 1\,400$ nucleotide corespunzînd deci la 1–2 gene de dimensiuni submijlocii) caracterizate printr-o mare mobilitate, decurgînd din capacitatea lor de transpoziție. Ele se integrează în anumite situsuri în structura cromosomilor sau a plasmidelor, de unde se pot elibera prin excizie, pentru a se reînsera în alte situsuri pe același cromosom sau pe altă entitate genetică (*replicon*) prezentă în celula bacteriană. De aici, denumirea de „gene care sar”, „gene călătoare”. În unele cazuri, ele limitează diferite gene structurale, formînd împreună cu acestea o categorie specială de elemente genetice transpozabile — numite *transpozoni*. Ca și secvențele de inserție, transpozonii se pot muta de la un situs la altul, pe același genom sau pe genomuri diferite.

6) În sfîrșit, cromosomul bacterian conține $\sim 10 - 20$ de gene care poartă informația pentru sinteza ARNr și ~ 50 gene pentru sinteza ARNt, situate în sectoare diferite ale ADN. El mai conține unități funcționale care controlează replicarea (replicator), o genă *inițiator* al cărei produs difuzibil interacționează specific cu replicatorul, pentru a declanșa un nou ciclu de replicare, precum și *suprafețe de legare* cu mezosomul sau cu alt situs membranar al celulei bacteriene.

Secvențele repetate invers („inverted repeated DNA sequences”) sînt secvențe nucleotidice care se citesc identic într-o polaritate chimică dată (spre exemplu, $5' \rightarrow 3'$), dar care sînt prezente pe catene opuse ale ADN. Transcrierea genetică a unui segment de ADN care conține o

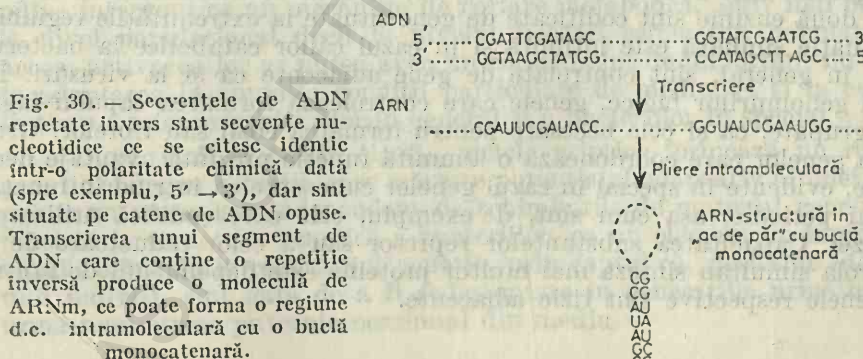


Fig. 30. — Secvențele de ADN repetate invers sînt secvențe nucleotidice ce se citesc identic într-o polaritate chimică dată (spre exemplu, $5' \rightarrow 3'$), dar sînt situate pe catene de ADN opuse. Transcrierea unui segment de ADN care conține o repetiție inversă produce o moleculă de ARNm, ce poate forma o regiune d.c. intramoleculară cu o buclă monocatenară.

repetiție inversă produce o moleculă de ARNm, care poate forma o regiune dublu catenară intramoleculară, în care cele două catene sînt legate printr-o buclă monocatenară (fig. 30). După denaturarea ADN, aceste secvențe

au tendința de a forma structuri cu formă de „ac de păr” („hairpin”) prin plierea înapoi a moleculei monocatenare. De aceea, ele sînt numite secvențe „foldback” sau „snapback”. În moleculele de ADN dublu catenar, repetițiile inverse sînt regiuni cu un ax de simetrie rotațională de tip 2. Într-un cît prin „citirea” fiecărei catene este transcris același mesaj genetic, aceste secvențe au structura unui palindrom. Prin definiție, un palindrom (gr. palin = înapoi, invers, din nou și dromos = cursă, drum, mers) este un cuvînt sau o frază care este citită identic în ambele sensuri.

Secvențele repetate invers sînt foarte frecvente în structura genomurilor eucariote. Ele formează ~ 6% din genomul uman, numărul lor fiind de 2×10^6 per set haploid de cromosomi (Dott și colab., 1976). La procariote, sînt mai rare și în general scurte, localizate, în special, la nivelul situsurilor de clivare ale endonucleazelor de restricție, la situsurile de legare ale proteinelor, cu rol în reglare, și la cele de origine a replicării în cromosomul bacterian.

Inițial, se considera că diferitele gene sînt aranjate la întimplare în structura cromosomului bacterian sau viral. Există în prezent însă numeroase exemple care demonstrează că o mare proporție din genele ce participă în codificarea anumitor funcții sînt situate în grupuri sau în regiuni limitate ale genomului. În general, în cazul genelor care coordonează o anumită cale metabolică, succesiunea lor de-a lungul cromosomului corespunde ordinei în care produșii lor (de regulă, proteine enzimactice) participă în reacțiile succesive ale căii respective. Au fost semnalate și o serie de situații deosebite, legate de faptul că, în unele cazuri, aranjarea genelor nu respectă totdeauna ordinea intrării în acțiune a produselor lor. Astfel, regiunea *his*, care codifică sinteza histidinei la *Salmonella typhimurium* include 10 gene, corespunzătoare celor zece enzime necesare pentru conversia fosforibozilpirofosfatului la histidină. Raportată la succesiunea lor în lanțul de reacții de biosinteză, ordinea genelor este 2, 3, 6, 4, 5, 7, 9, 8, 10, 1, ceea ce demonstrează că primele două enzime sînt codificate de gene situate la extremitățile regiunii. O situație similară este întîlnită și în cazul căilor catabolice la bacterii, care, în general, sînt controlate de gene adiacente ca și la virusuri. În cazul genomurilor fagice, genele care controlează formarea capului fagic sînt grupate, ca și cele necesare pentru formarea cozii sau fibrelor. Gruparea genelor care coordonează o anumită funcție prezintă avantaje deosebite, evidente în special în cazul genelor cunoscute ca intrînd în funcție numai periodic, așa cum sînt, de exemplu, cele care codifică utilizarea lactozei. Capacitatea substanțelor represor sau a celor inductoare de a controla simultan sinteza mai multor proteine este dependentă de faptul că genele respective sînt fizic adiacente.

Genele criptice și rolul lor în evoluția microorganismelor

Genele „tăcute” („silent genes”) au fost descrise la eucariotele superioare sub două forme:

- 1) Genele „egoiste” („selfish genes”) care se prezintă sub forma unor secvențe „tăcute” de ADN, ce se pot răspîndi în genom prin formarea

unor copii adiționale ale lor înșile și care nu aduc nici o contribuție la adaptarea („fitness”) organismului-gază (Dawkins, 1976; Doolittle și Sapienza, 1980; Orgel și Crick, 1980). Termenul „egoist” este probabil nepotrivit, datorită caracterului său prea marcat antropomorf, dar exprimă corect faptul că acest ADN nu face altceva decât să-și asigure propria sa reproducere.

2) *Pseudogenele*, reprezentate de regiuni de ADN omologe unor secvențe codificatoare, dar care conțin mutații ce împiedică exprimarea lor normală (Jacq și colab., 1977; Lauer și colab., 1980; Li și colab., 1981). Acest tip de gene au fost considerate ca absente la microorganisme, până când Hall, Yokoyama și Calhoun (1983), interpretând unele cercetări proprii și ale altor autori, au ajuns la concluzia existenței lor, atît la microorganismele procariote, cit și la cele eucariote, deși în cele mai multe cazuri existența lor nu este relevată de examinarea directă. Ei au formulat conceptul de *gene criptice* pentru a caracteriza secvențele de ADN fenotipice „tăcute” care în mod normal nu sînt exprimate în cursul vieții unui individ, dar care sînt capabile de reactivare — ca un eveniment rar — în cîteva celule dintr-o populație mare, ca rezultat al intervenției unor mutații, recombinări, elemente genetice transpozabile sau altor mecanisme genetice.

Detectate inițial la *E. coli K 12*, odată cu descoperirea pseudogenei *ilv G* și prin activarea mutațională a operonului *bgl* BSRC (*bgl* = β -glucozid), genele criptice ar fi prezente în general la microorganisme. Deși în mod obișnuit nu sînt exprimate la nivel funcțional fiziologic, sînt menținute în cursul dezvoltării populațiilor bacteriene probabil din mai multe motive: 1) ele pot prezenta un mare avantaj pentru creștere, deoarece ar putea aparține unui sistem superior de reglare metabolică; 2) exprimarea unor gene criptice sub influența unor factori din mediu ar putea determina supraviețuirea numai a acelor membri ai populației respective care au păstrat o genă criptică într-o formă funcțională; 3) genele criptice ar putea interveni ca un mecanism de reglare metabolică, activ mai degrabă la nivel populațional decît la nivelul fiecărei celule din populație. De aceea, activarea lor ar putea avea un rol deosebit de important nu numai în adaptarea la anumite condiții particulare de mediu, ci și în evoluția în timp a microorganismelor în general și a bacteriilor în special.

După Hall și colab. (1983), genele criptice formează un rezervor genetic endogen versatil, care mărește potențialul adaptativ al unei specii, printr-un mecanism independent de schimburile de material genetic. Ele persistă în structura genetică a bacteriilor, ca un element cu importanță vitală, mărindu-le repertoriul genetic, prin faptul că, deși sînt tăcute la unii indivizi, sînt gata de a fi redeșteptate în generațiile următoare, în urma unui stress puternic ocazional din mediu.

Interacțiuni genetice în celula bacteriană

Prezența concomitentă în celula bacteriană a unor structuri genetice diferite este urmată de o serie de interacțiuni mai mult sau mai puțin evidente.

Interacțiunea dintre cromosomul bacterian și plasmide. Relațiile dintre cromosomul bacterian și plasmide pot îmbrăca mai multe forme, dintre care unele (integrarea plasmidelor cu funcții episomale în cromosom sau controlul acestuia asupra replicării plasmidelor) au o importanță deosebită pentru biologia bacteriilor (vezi cap. Plasmidele). Existența unor interacțiuni între cromosomi și plasmide a fost sugerată de o serie de observații, chiar în cazul plasmidelor fizic autonome în citoplasmă. Hohn și Kern (1969) au arătat că ADN plasmidial, deși nelegat covalent de cromosomul bacterian cosegregă cu acesta, probabil datorită unei asocieri mutuale cu elemente comune ale membranelor celulare. Kline și Miller (1975) pledează pentru existența unor asocieri fizice necovalente între plasmide și cromosom, al căror grad pare să fie determinat de genotipul plasmidelor și nu de mărimea lor. Astfel, plasmida F neintegrată sedimentează concomitent cu ADN cromosomal, spre deosebire de plasmida Col E1, care pare răspîdită la întîmplare în celula bacteriană, în așa fel încît numai 1—2 copii ($\sim 10\%$ din numărul total/celulă) sînt asociate cu cromosomul bacterian. Asocierea necovalentă cu cromosomul pare să fie o proprietate comună tuturor plasmidelor, unele comportîndu-se similar plasmidei F, iar altele plasmidei Col E1. S-a mai demonstrat că plasmidele nelegate de cromosom segregă în minicelule (care nu au cromosom), în timp ce cele asociate cu cromosomul rămîn în celula-mamă, ca și acesta, sau segregă foarte slab. Mecanismul asocierii nu este cunoscut. Complexele cromosom—plasmide neintegrate se formează probabil cînd ADN plasmidial circular formează o buclă adițională sau un domeniu superhelical în cromosomul bacterian.

Interacțiunea dintre cromosomul bacterian și genomul fagice. Infecția celulei bacteriene cu genomul unui fag virulent are efecte profunde asupra cromosomului acesteia. După 2—3 minute de la infecție, nucleoidul suferă un proces de dezorganizare, urmat de deplasarea sa din localizarea normală, centrală, în apropierea membranei celulare. Infecția cu fagul T4, spre exemplu, creează noi situsuri de legare cu membrana celulară, sub acțiunea unor produși ai genelor virale, apoi ADN bacterian este dispersat în citoplasmă. Izolat în condiții care păstrează structura sa nativă, el este repliat, dar intact (Smustad și colab., 1974). Aceasta demonstrează că inițial efectul major al infecției fagice se exercită nu asupra integrității cromosomului, ci asupra interacțiunilor stabilizatoare sau de organizare tridimensională. Ele sînt codificate de gena *unf* T4 (engl. unfold = a desface, a extinde, a deplia). Ulterior, nucleazele virale degradează ADN cromosomal.

Un alt tip de interacțiune este *lizogenia*, bine cunoscută în cazul cuplului fag λ —*E. coli* *.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 231.

Elementele genetice accesorii

Elementele genetice accesorii (EGA), numite și extracromosomale sau elemente ADN accesorii (Campbell, 1981), sînt reprezentate de plasmide, secvențele de inserție (SI), transpozoni (Tn) și de unii bacteriofagi. Considerarea unor fagi ca EGA este justificată de existența *proceselor de conversie fagică sau lizogenă*, prin care prezența unui fag temperat, integrat ca profag în cromosomul bacterian, sau manifestarea la nivel scăzut a prezenței unor virioni activi, în celula bacteriană, îi conferă acestuia noi proprietăți fenotipice (spre exemplu, capacitatea de a produce exotoxină difterică la *Corynebacterium diphtheriae*, în cazul prezenței profagului β).

EGA se deosebesc de informația cromosomală prin anumite proprietăți definitorii: 1) includ informație genetică accesorie, neesențială pentru reproducerea organismului care le poartă; unele dintre ele (SI) nu conferă nici un caracter nou fenotipic, în afară de cele rezultate din acțiunea lor asupra genelor „țintă”; 2) sînt capabile de replicare și chiar de suprareplicare („over-replication”) în raport cu cromosomul gazdei. Unele EGA, ca fagii și plasmidele, se pot replica fizic separat de cromosom și această replicare este prin ea însăși o suprareplicare. În cazul plasmidelor, în faza de creștere echilibrată, ADN plasmidial se replică cu aceeași viteză medie ca și ADN cromosomal, chiar în cazul plasmidelor cu copii multiple. Suprareplicarea apare în special în două situații: 1) cînd numărul plasmidelor crește în raport cu cel din faza staționară; 2) în timpul transferului intercelular al plasmidelor conjugative, care este asociat cu replicarea: o copie a plasmidei rămîne în celula donatoare și alta trece în celula receptoare, asigurînd caracterul infecțios al procesului. Datorită faptului că apariția unei SI sau Tn într-o localizare nouă, prin transpoziție, este corelată cu replicarea lor și nu determină pierderea concomitentă a celor vechi, și acest proces reprezintă tot o formă de suprareplicare, deși nu evoluează fizic autonom. Chiar în cazul în care sînt nocive pentru celula-gazdă, EGA nu pot „supraviețui” în natură decît prin suprareplicare.

Selecția pe termen lung a favorizat însă EGA care sînt într-un anumit fel benefice pentru celula-gazdă. După Campbell (1981), cele mai multe gene preluate și transferate de EGA în cursul interacțiunilor ADN/ADN tind să fie pierdute în cursul generațiilor următoare. Face excepție cele a căror incorporare în stocul („pool”) de gene accesorii, care „înoată” în lumea bacteriană, le conferă acestora avantaje de supraviețuire pe termen lung. Faptul că, spre deosebire de fagi, plasmidele SI și Tn sînt mai degrabă constituenți celulari decît agenți patogeni permite presupunerea că ar

putea avea unele funcții utile. Existența EGA are o importanță deosebită pentru bacterii, care au ales ca strategie de supraviețuire în natură dimensiunile mici ale celulei și ale genomului, metabolismul rapid și perfect reglat, multiplicarea rapidă și prezența unor populații foarte mari. Existența separată a ADN eucromosomal și accesoriu reprezintă, în același timp, o formă de economie de material genetic și de activități metabolice. Prezența EGA amplifică mărimea efectivă a genomului unei specii, fără ca să impună fiecărui individ dintr-o populație sarcina de a purta întregul genom potențial al speciei și deci numeroase gene care nu îi sînt necesare în mod permanent. Menținute pe plasmide sau pe Tn, genele accesorii sînt disponibile pentru toate celulele, deși nu sînt prezente efectiv în structura lor. În tot acest timp, celula bacteriană nu este obligată să poarte sarcina metabolică de replicare și eventual de traducere la proteine a unor gene necesare numai în condiții speciale de mediu. Posibilitatea transmiterii lor interspecifice sau chiar intergenerice oferă celulelor bacteriene posibilitatea de a face economie de material genetic și de a dispune în același timp prompt de EGA prin două mecanisme: 1) prin preluarea lor din rezerva de gene a altor celule, aparținînd aceleiași specii sau uneori unor specii sau chiar genuri îndepărtate; 2) prin mărirea numărului tulpinilor și celulelor capabile să acționeze ca rezervoare permanente pentru unele gene, care pot fi complet absente în altele.

Suprareplicarea elementelor genetice accesorii și limitele ei. Una din proprietățile elementelor genetice accesorii este tendința lor de supra-replicare, în raport cu informația genetică cromosomală. Este evident — atît pe baza unor observații practice, cît și a unor considerente teoretice, că supra-replicarea lor extensivă este nocivă, atît pentru celula bacteriană, cît și pentru elementele accesorii înșile. Suprareplicarea și sinteza produsilor genelor pe care le conțin reprezintă o încărcătură metabolică pentru celulă, chiar atunci cînd efectele nu sînt în mod evident foarte grave. Suprareplicarea este foarte caracteristică fagilor, în cursul inducției litice, cînd avantajul „supraviețuirii” lor compensează efectul negativ asupra bacteriei gazdă. Dar, și în acest caz, este evident că evoluția pe termen lung a favorizat complexe echilibrate, în care virusurile au efecte minime asupra bacteriilor-gazdă. Virusurile foarte virulente ies din circuitul normal al evoluției, pentru că moartea celulelor-gazdă duce la propria lor dispariție. Relația moderată tipică corespunde fagilor temperați, al căror genom este transmis de la o generație la alta, cu o cheltuială metabolică minimă pentru gazdă. În plus, celula bacteriană limitează această cheltuială și pe alte căi, ca, de exemplu, prin limitarea numărului de specii diferite de profagi și/sau a numărului de copii din fiecare specie. Situații similare au fost descrise și în cazul plasmidelor a căror sinteză excesivă este îngrădită pe diferite căi.

După Campbell (1981), în cazul plasmidelor conjugative, controlul se exercită pe două căi și anume asupra transferului și asupra replicării. La multe plasmide conjugative, sinteza pililor este controlată prin represie. Astfel, cînd plasmida intră într-o celulă care nu poartă o plasmidă de același tip, urmează o perioadă tranzitorie, de sinteză rapidă a pililor, după care se instalează represia: celula evită risipa, încetînd sinteza pilinei, în celulele care au puține șanse de a-și transfera ADN într-o celulă receptoare. De asemenea, transferul plasmidelor între celule care poartă deja o plas-

midă de același tip (ca, de exemplu, în conjugarea $F^+ \times F^+$) este limitat pe două căi: două gene codificate de factorii F (*tra S* și *tra T*), care normal asigură separarea exconjuganților la sfârșitul procesului sexual, induc sinteza unor proteine de suprafață, ce interferă cu proprietățile de receptor ale celulei respective. În cazurile rare, în care o plasmidă depășește aceste bariere, replicarea ei în celulă este reglată în așa fel, încît niciodată nu vor fi transmise ambele plasmide la descendenții acesteia.

După Heffron și colab. (1979), chiar și deplasarea transpozozonilor (Tn) este reglată, în unele cazuri ($Tn 3$), prin intermediul unui represor, care controlează sinteza transpozazei.

În concluzie, se poate afirma că replicarea elementelor genetice accesorii este reglată în așa fel, încît efectele lor nocive asupra celulelor-gazdă sînt minimalizate. Evoluția îndelungată a favorizat acele cupluri în care suprareplicarea este limitată și, în mod cu totul special, pe cele în care elementul genetic accesoriu conferă anumite beneficii celulei-gazdă. Aceasta ar fi, după Campbell (1981), o probă că elementele genetice accesorii ar fi produse înalt evolute ale selecției naturale. El a descris două căi în care existența autonomă a EGA poate avea valoare selectivă pentru specia-gazdă:

1) *Selecția directă a EGA* însuși, în cazul în care codifică un caracter fenotipic necesar, așa cum ar fi selecția $Tn5$, de rezistență la kanamicină (Kn), la bacteriile expuse acestui antibiotic. Funcția de supareplicare (sau în acest caz de transpoziție) permite amplificarea EGA și, eventual, deplasarea lui la alt situs, în aceeași plasmidă, de la o plasmidă la alta sau de la o celulă la alta. Deoarece rezistența la Kn nu este necesară tuturor celulelor care aparțin speciei respective, gena Kn^R nu devine constituent permanent al cromosomului bacterian.

2) *Selecția la nivel populațional*: EGA care stimulează transferul de gene sau rearanjările genetice pot genera uneori noi combinații de gene mai avantajoase, care rămîn legate strîns de EGA ce le-a format. După Starlinger (1980), aceste procese au funcționat, probabil, în cursul primelor perioade ale evoluției, precedînd apariția recombinărilor omologe.

Apariția de noi EGA se face probabil prin modificarea celor preexistente, printr-o serie de mecanisme diferite, inclusiv prin încorporarea de gene cromosomale și mai puțin probabil *de novo*. Experimental, utilizînd numai mijloace fiziologice naturale pot fi constituite în laborator EGA, care pot conține, teoretic, orice genă a celulei gazdă. Este de conceput deci, că un proces similar ar putea avea loc și în natură (Campbell, 1981).

Plasmidele

(Pl. 9—10)

Plasmidele sînt elemente genetice spațial separate de cromosomul bacterian (elemente genetice extracromosomale), capabile de replicare fizic independentă de cromosom (repliconi), care pot fi perpetuate stabil în aceste condiții. Conțin informație genetică neesențială pentru creșterea celulelor normale ale speciei-gazdă, în așa fel încît pot fi dobîndite sau pierdute, fără a afecta viabilitatea acestora (Lederberg, 1952; Novick, 1976). Adesea au fost considerate ca avînd capacitate de replicare „autonomă”, ceea ce este numai parțial adevărat, datorită controlului exercitat de cromosomul bacterian. În categoria plasmidelor tipice intră *plasmidele F, Col, R, de toxigenitate* etc.

Existența unor deosebiri nete între plasmide și bacteriofagi temperați a dus la excluderea acestora din urmă din categoria plasmidelor, bazată pe următoarele proprietăți (Helinski, 1979):

1) Plasmidele sînt limitate la o existență intracelulară, în timp ce fagi tipici pot exista și extracelular sub forma unor particule virale infecțioase.

2) Plasmidele se replică autonom, fără să afecteze viabilitatea celulelor-gazdă, în timp ce replicarea fagului temperat este însoțită de sinteza a numeroase proteine structurale și enzimatică și de moartea celulei-gazdă;

3) În cazurile în care informația genetică fagică persistă în celulă, ea nu este autonomă, ci integrată în cromosomul bacterian ca profag. Există și excepții, ca de exemplu fagul *P1*, la care profagul se replică liber față de cromosomul bacterian (Ikeda, 1968), comportîndu-se ca o plasmidă tipică, cu toate că produsul replicării sale vegetative sînt particule fagice mature. În mod asemănător se comportă formele replicative ale fagilor *f1, f2* și *M13* ai *E. coli*, care sînt moștenite într-o stare extracromosomală stabilă, caracterizată prin producerea continuă de particule fagice infecțioase (Hofman-Berling, 1964).

Ținînd seama de o serie de fapte de observație se poate afirma că unele plasmide (*P1, f2* etc.) sînt fagi, dar cei mai mulți fagi nu sînt plasmide. Plasmidele au probabil o răspîndire universală la bacterii, fiind găsite într-o anumită perioadă a existenței lor la toate speciile. Pînă în prezent au fost izolate peste 1 000 de tipuri de plasmide diferite, prezente în mod natural, în special la bacteriile Gram-negative. Numai de la *E. coli* au fost izolate 269 plasmide diferite (Birge, 1981) (tabelul nr. 8).

Tabelul nr. 8

Exemple de plasmide prezente la *Escherichia coli*, cu prezentarea citorva caracteristici de structură și funcție, comparativ cu cromosomul bacterian (după datele lui Noviek, 1971 și Lewin, 1977)

	Cromosomul <i>E. coli</i>	Plasmida F	Plasmida <i>R 100-1</i>	Plasmida <i>Col E1</i>	Plasmida <i>Col 1b-P 9</i>
Fenotipul	—	Fertilitate Pili F	Rezistență la antibiotice Pili F	Producere de colicine	Producere de colicine Pili I
Greutatea moleculară ($\times 10^6$ dal)	$\sim 2,5 \times 10^3$	~ 63	~ 55	$\sim 4,2$	62—68
Perechi de baze nu- cleotidice (kilobaze)	$\sim 4,1 \times 10^3$	$\sim 94,5$	~ 88	$\sim 6,4$	~ 110
Lungimea	$\sim 1\ 100\ \mu\text{m}$	$\sim 30\ \mu\text{m}$	$\sim 28\ \mu\text{m}$	$\sim 3\ \mu\text{m}$	$\sim 30\ \mu\text{m}$
Numărul de gene	$\sim 4\ 000$	~ 100	~ 90	~ 6	~ 110
Numărul de copii/celulă	1—2	1—2	1—2	10—15	1—2
Funcția de conjugon	—	+	+	—	+
Tipul de compatibili- tate	—	Inc F I	Inc F II	—	Inc Iz
Inhibarea fertilității factorului F (fi+)	—	—	+	—	—

Plasmidele celulelor eucariote. Existența plasmidelor în sistemele eucariote este controversată. Structuri de tip plasmidial capabile de replicare fizic autonomă au fost descrise în citoplasma sau în mitocondriile mai multor organisme. Există date privind prezența unor plasmide „adevărate”, fără nici o analogie cu ADN mitocondrial, la unele plante superioare ca *Zea mays*, *Beta vulgaris* și *Vicia faba*, deși Kemble și Bedrook (1980) consideră că natura lor necesită confirmări suplimentare. Plasmide asociate cu mitocondriile, dar independente de genomul acestora, au fost descrise la *Neurospora crassa*, *N. intermedia* și *Claviceps purpurea* (Hollenberg, 1982). Cel mai mult studiate sînt plasmidele descrise la *Saccharomyces cerevisiae*. Astfel, plasmidele $2\ \mu\text{m}$, prezente la cele mai multe tulpini în nucleoplasmă, în ~ 50 de copii/celulă, au structura de molecule de ADN dublu catenare circulare închise covalent, cu o lungime de $\sim 6\ 300$ pb. ADN $2\ \mu\text{m}$ este „împachetat” în nucleosomi, care au un complement normal de histone. Asemenea celor mai multe plasmide bacteriene, ADN $2\ \mu\text{m}$ are o singură origine a replicării. În plus, codifică două funcții „REP” (probabil proteine încă neidentificate), care amplifică numărul plasmidelor $2\ \mu\text{m}$, cînd numărul copiilor lor este scăzut. Ele asigură stabilitatea ADN $2\ \mu\text{m}$ în celulele levurilor.

În condiții normale, plasmida $2\ \mu\text{m}$ se replică cu aceeași viteză ca și restul genomului. Cînd numărul copiilor scade, proteinele REP pot „să ignore” cuplarea normală a replicării plasmidelor cu ciclul celular, inițiind cicluri de replicări multiple ale ADN $2\ \mu\text{m}$ pînă cînd numărul copiilor acestuia este readus la 30—50 per celulă (Watson și colab., 1983).

Clasificarea plasmidelor

Plasmidele sînt denumite și clasificate în mod curent după efectul lor cel mai evident, produs asupra celulelor-gază (fertilitate, colicinogeneză, rezistență la antibiotice etc.). Utilizată pentru nevoile curente,

această clasificare este nesatisfăcătoare, în primul rând pentru faptul că multe plasmide au mai mult de un efect (spre exemplu, plasmidele R pot purta în același timp determinanți genetici de conjugare și de rezistență la antibiotice). În plus, plasmidele pot pierde sau câștiga prin recombinare diferite proprietăți noi, caracteristice. Pentru a evita aceste neajunsuri, s-a propus clasificarea plasmidelor pe criteriul „incompatibilității” lor, adică al capacității lor de a exclude alte plasmide de același tip de la coexistența în aceeași bacterie (Datta, 1975). Pe acest criteriu au fost descrise la bacteriile Gram-negative peste 30 de grupuri de incompatibilitate (Helinski, 1977).

În funcție de capacitatea lor de a media transferul de material genetic prin conjugarea celulelor bacteriene, plasmidele aparțin la două categorii diferite :

1) *Plasmidele conjugative (transmisibile sau infecțioase)*, numite și *factori de sex*, controlează stabilirea în celula-gazdă a stării de donator de material genetic și apariția unor caractere fizice noi (apariția pililor de sex etc.), care permit transferul de material genetic de la celula purtătoare de plasmidă (donator) la celulele fără plasmidă (receptor). Plasmidele conjugative sînt cunoscute și sub denumirile de *conjugoni*, *factori de fertilitate* sau *transferoni* și au în structura lor genetică, pe lângă genele de replicare autonomă, gene care stimulează formarea de cupluri de încrucișare între bacterii. În categoria plasmidelor conjugative intră plasmidele de sex, în diferitele lor variante (*F*, *Hfr* și *F'*), plasmidele „*Ent*” și unele plasmide „*Col*” și „*R*”.

2) *Plasmidele neconjugative*, ca, de exemplu, celelalte tipuri de factori *Col* și *R* nu sînt autotransmisibile și în consecință nu sînt infecțioase, deoarece nu conferă starea de donator de material genetic. Ele sînt lipsite de genele *tra*, care asigură transferul prin conjugare al materialului genetic. Transferul lor se realizează prin intermediul unui fag transductor sau datorită prezenței concomitente în celula bacteriană a unei plasmide de sex (tabelul nr. 9).

Tabelul nr. 9

Plasmidele conjugative și neconjugative (după Helinski, 1977, modificat)

Clasa	Tipul de plasmidă	Regiunile genetice conținute	
		Comune	Specifice
Plasmide conjugative (plasmide de sex)	F' Col R Ent	Replicare autonomă + transfer („tra”)	Gene provenite din cromosomul bacterian Producere de colicine Rezistență la antibiotice Producere de enterotoxină
Plasmide neconjugative	Col (unele) R (unele)	Replicare autonomă	Producere de colicine Rezistență la antibiotice

În funcție de capacitatea lor de integrare în cromosomul bacterian, plasmidele se împart în două categorii:

1) *Plasmidele cu funcții episomale* (episom = corp adăugat; Jacob, 1958) pot exista alternativ în stare autonomă (libere în citoplasmă) sau integrate — incorporate în genomul celulei-gazdă. În această categorie intră plasmida de sex F și plasmida *Col E1*.

2) Celelalte plasmide, ca factorul *Col*, răspunzător de fenomenul de colicinogeneză, și factorul F' (derivat al plasmidei F integrate, care a incorporat un fragment de cromosom bacterian), sînt incapabile de integrare în genomul celulei-gazdă și de aceea persistă indefinit numai în stare autonomă.

Structura moleculară a plasmidelor

Plasmidele sînt cromosomi miniaturali (minicromosomi) alcătuiți din molecule de ADN d.c. circulare închise covalent (uneori cu o proporție variabilă de molecule, cu configurație circulară deschisă). Circularitatea este o condiție esențială pentru „supraviețuirea” lor în celula procariotă. Ele sînt, ca urmare, elemente genetice analoge structural și funcțional cromosomului bacterian, caracterizate prin cinci proprietăți distincte: 1) dimensiunea mai mică ($\sim 1-2\%$ din mărimea cromosomului); 2) conținutul în baze (G + C) diferit de cel cromosomal, datorită prezenței unei informații genetice diferite; 3) prezența unor proprietăți structurale particulare, ca, de exemplu, forma superhelicală, forma concatemă etc.; 4) conțin informație genetică accesorie (adică neesențială pentru multiplicarea bacteriilor în mediul lor natural și de aceea pot fi pierdute fără a prejudicia viabilitatea bacteriilor respective); 5) funcționează ca un replicon capabil de replicare „autonomă”, fizic independentă, dar în general corelată cu ritmul de replicare al cromosomului, fiind legate printr-o punte intermoleculară cu mezosomul și deci indirect cu cromosomul bacterian.

Masa moleculară a plasmidelor variază între $1,5 \times 10^6$ și 150×10^6 dal (Sherratt, 1974), cele mai mari dimensiuni fiind atinse de plasmidele conjugative (megaplasmitide). Plasmidele *Col* neconjugative au numai $\sim 5 \times 10^6$ dal și o lungime de 2,3 μm (cromosomul *E. coli* are $\sim 2,5 \times 10^9$ dal).

Cu ajutorul tehnicilor fizice s-a demonstrat că ADN plasmidial poate fi găsit în celulele bacteriene în trei forme diferite:

1) Forma I, numită și CCC („Covalently closed circular”) sau „D” este cea mai frecventă și corespunde moleculei dublu catenare circulare, închisă covalent pentru a constitui un inel, care prezintă în plus una sau două torsiuni, ce dau moleculei aspectul de superhelice. Această stare fizică facilitează mult izolarea plasmidelor din celula bacteriană, utilizînd tehnica centrifugării în gradient de densitate. Toate plasmidele studiate pînă în prezent apar într-o fază a existenței lor în această formă. Sub influența a diferiți agenți (ca bromura de etidiu) ea poate să treacă în forma inelară „relaxată”, I'.

2) Forma II (sau „E”) corespunde formei circulare „deschise”, avînd o catenă închisă și una deschisă.

3) În unele cazuri, plasmidele au în structura lor mai mult decît un genom și sînt *multimere* sau *oligomere*. În cazul în care sînt formate din genomuri identice, legate cap la cap, linear [sau circular, ele formează structuri numite *concatemere* sau *oligomere concatenate*. Ele apar fie ca rezultat al unor erori în replicarea monomerilor circulari, fie în urma unor procese de recombinare reciprocă. În alte cazuri, plasmidele formate din molecule circulare închise, superhelicale sau circulare deschise monocatenar se pot înălța (unele în altele ca zalele unui lanț), formînd oligomere catenate sau catenani (fig. 31), probabil prin recombinare. Aceste forme nu trebuie confundate cu cele ale plasmidelor recombinante, care rezultă din legarea într-o structură unică a unor genomuri diferite (Preer și Preer, 1977).

PLASMIDE MONOMERE

Circulare închise covalent



Circulare deschise



PLASMIDE OLIGOMERE

Concatenate



Catenate



Fig. 31. — Diferitele configurații ale ADN plasmidial.

Structura genetică și funcțiile plasmidelor

Plasmidele conțin în structura lor determinanți genetici esențiali pentru „supraviețuirea” lor ca entități ce se replică fizic independent (gene necesare pentru replicare), gene de specificitate pentru incompatibilitate și regiuni neesențiale în care sînt localizate gene ce afectează fenotipul bacteriei-gazdă (gene de transfer, pentru diferite activități metabolice sau de rezistență la antibiotice, substanțe toxice etc.). Multe plasmide au regiuni a căror expresie fenotipică este încă necunoscută.

Folosind diferite metode, s-a stabilit harta genetică a mai multor plasmide, demonstrîndu-se prezența și localizarea mai multor categorii de determinanți genetici, incluzînd în funcție de natura și de mărimea lor: a) gene necesare pentru replicare; b) suprafețe de legare de mezosomi, care asigură corelarea replicării plasmidei cu ciclul celular și repartizarea lor după diviziune; c) secvențe de inserție (*SI1*, *SI2*, *SI3*); d) în unele cazuri, un operon de transfer (complex de gene care cuprinde determinanți pentru sinteza pililor de sex, a antigenelor celulare de recunoaștere și de control pozitiv al expresiei operonului); e) gene structurale, care determină funcții noi ce se manifestă în fenotipul celulei gazdă.

Caracterele conferite de prezența plasmidelor celulei bacteriene acoperă o gamă foarte largă de funcții și proprietăți noi între care cele mai importante sînt următoarele:

- 1) rezistența la diferiți agenți bacterieni (antibiotice ca penicilina, ampicilina, cefalosporinele, streptomicina, kanamicina, neomicina, gentamicina, tetraciclina, cloramfenicol etc. și sulfamidele);
- 2) rezistența la metale ca Hg^{2+} , Cd^{2+} , Bi, Pb și la ionii arseniat și arsenit;

- 3) rezistența la UV;
- 4) producerea unor toxine și/sau factori de virulență și patogenitate ca, de exemplu, enterotoxina (*Ent*), hemolizina (*Hly*), factorul de virulență (*Col V*) la *E. coli*;
- 5) producerea de bacteriocine (plasmidele *Col*);
- 6) inducerea de tumori la plante (plasmida *Ti* la *Agrobacterium tumefaciens*);
- 7) capacitatea de a utiliza substanțe neobișnuite cum sînt camforul, octanul, numeroase hidrocarburi policiclice;
- 8) capacitatea de a metaboliza anumite substraturi, ca lactoza la *Proteus mirabilis* și *P. morgani*;
- 9) fermentația lactică (*Lactobacillus* sp.);
- 10) formarea vacuolelor cu gaze la *Halobacterium*;
- 11) capacitatea de a asigura transferul de material genetic prin conjugare și formarea structurilor specifice corespunzătoare (pili de sex);
- 12) producerea de antibiotice ca metilenomicina, actinorodina, cloramfenicolul etc. (tabelul nr. 10).

Tabelul nr. 10

Proprietăți codificate de plasmide prezente în natură

Proprietatea	Bacteria-gazdă naturală	Denumirea plasmidei
Fertilitate (capacitatea de transfer de material genetic prin conjugare)	<i>E. coli</i>	F, R1, Col 1
Producere de bacteriocine	<i>Enterobacterium cloacae</i> <i>E. coli</i>	C10 DF 13 Col E1
Rezistență multiplă (infecțioasă) la antibiotice	<i>E. coli</i>	R 222
Rezistență la metale grele Cd ²⁺ , Hg ²⁺	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	pI 258, R 6 Col I b, R 46
Producere de antibiotice	<i>Streptomyces coelicolor</i> <i>Clostridium tetani</i>	SCP 1 pCL 1
Producere de neurotoxină	<i>E. coli</i>	Ent
Producere de enterotoxină	<i>E. coli</i>	Col V, Hly
Factori de virulență, hemolizina		
Metabolismul camforului, octanului	<i>Pseudomonas</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Cam, Oct Ti
Producere de tumori la plante		
Restricție / modificare (producerea endonucleazei Eco R 1 și a metilazei)	<i>E. coli</i>	Ry 13

În general, în structura plasmidelor, regiunile esențiale și cele neesențiale nu sînt amestecate. Astfel, genele răspunzătoare de replicarea lor autonomă sînt grupate într-un segment relativ mic al moleculei, care include regiunea corespunzătoare originii (*ori*) replicării (Timmis, 1978).

Face excepție plasmida *RR* 2 la care genele pentru replicare sînt distribuite pe o porțiune largă a ADN circular (Meyer, 1977). În mod similar, genele răspunzătoare de proprietățile de transfer și conjugare sînt grupate într-un operon unic (Achtman, 1972; Sharp, 1972). În cazul plasmidelor cu rol în conjugare, hărțile genetice construite pînă în prezent scot în evidență o mare similaritate, cel puțin în ceea ce privește regiunile ce conțin genele implicate în transfer care prezintă un grad mare de omologie, reflectînd, probabil, o origine comună (Beale și Knowles, 1978).

Autonomia plasmidelor. Novick (1980) consideră că plasmidele reprezintă expresia unui ultim stadiu al simbiozei, fiind dependente de toate sistemele care asigură existența celulei-gazdă, cu excepția „funcțiilor autonome” care le determină individualitatea, din care decurg replicarea, distribuția copiilor sale în celulele-surori, în așa fel încît să se mențină o relație constantă cu gazda. Lucrînd cu plasmida *RpI* 258 de la stafilococ, Novick (1980) a demonstrat că se pot îndepărta 2/3 din această plasmidă fără a afecta funcțiile sale de autonomie. Există însă o zonă mică (1/10 din plasmida *pI* 258) „interzisă”, la nivelul căreia orice deleție distruge „viabilitatea” plasmidei. Ea este situată la nivelul unei regiuni de ~ 3 000 de baze, numită de Matsubara (1966) regiunea care dirijează replicarea („replication drive unit”). Rolul acestei regiuni a fost demonstrat de Novick (1980): „plasmidele” reconstituite din fragmentele plasmidei originare, introduse într-o celulă bacteriană, se replică numai dacă au în structura lor această regiune.

Plasmidele eriptice formează o categorie aparte, fără efect aparent asupra fenotipului celulei-gazdă. S-ar putea ca ele să poartă informație numai pentru propria lor replicare sau să codifice și o serie de funcții adiționale, care vor fi detectate numai cînd vor fi folosite teste adecvate.

Plasmidele de virulență. Ørskov și colab. (1975) au descris existența unor tulpini de *E. coli* care produc îmbolnăviri severe de tip enteritic la copii, adulți și animale domestice. Spre deosebire de tulpinile de *E. coli* izolate de la oameni sănătoși, tulpinile enteropatogene au o serie de proprietăți adiționale: capacitatea de a elabora două tipuri de enterotoxină (termolabilă TL și termostabilă TS) și capacitatea de a coloniza suprafața epiteliului intestinal, datorită unor antigene proteice, similare pililor, pe suprafața celulelor bacteriene (antigenele de colonizare sau de aderență) (Ørskov și colab., 1975; Elwell și Shipley, 1980). Determinanții genetici ai enterotoxicității și ai antigenelor de suprafață sînt transmisibili, fiind purtați de plasmide specifice: *plasmida enterotoxinei* ($M \sim 55-61 \times 10^6$ dal), *plasmida antigenului de colonizare* și *plasmida de virulență* a *E. coli* invadant, care produce infecții generalizate, extraintestinale la om și animale. Elwel și Shipley (1980) consideră că numărul plasmidelor de acest gen este mult mai mare și mai răspîndit în populațiile bacteriene, unele exemple concrete fiind în curs de confirmare.

Plasmidele producătoare de antibiotice. Unele plasmide sînt implicate direct în sinteza unui număr important de antibiotice, deoarece poartă în structura lor informația genetică necesară pentru aceste sinteze (ca de exemplu, antibioticul *metilenomicina A* produs de *Streptomyces coelicolor* (Alecevic, 1976) sau *microcinele* — antibiotice oligopeptidice cu

$M < 500$ dal, produse de bacterii Gram-negative ca *E. coli*, *Ps. aeruginosa* s.a. (Bacquero, 1978). În cazul altor antibiotice (cloramfenicol, oxitetraclină, holomicină etc.), participarea plasmidelor este, de asemenea, certă, dar s-ar realiza printr-un mecanism încă nedemonstrat (Hopwood, 1978).

Plasmidele cu funcții metabolice. Unele plasmide au rol direct în metabolismul celular, deoarece poartă gene ce determină utilizarea unor substraturi normal inaccesibile bacteriilor respective (de ex., plasmida *lac* la *Proteus morganii* și *Pr. mirabilis*), care asigură metabolizarea lactozei. De asemenea, extraordinara versatilitate metabolică a bacteriilor din genul *Pseudomonas* s-ar datora prezenței a diferite plasmide care conțin gene pentru sinteza enzimelor capabile să permită utilizarea unor compuși organici foarte diferiți (camfor, acid salicilic etc.).

Replicarea și segregarea plasmidelor

Plasmidele sînt molecule de ADN capabile de replicare fizică independentă, „autonomă” (repliconi). Replicarea lor vegetativă are loc începînd de la un punct, originea replicării („ori”), și continuă la unele plasmide (Col E1) secvențial, unidirecțional sau la altele (plasmida RGK) bidirecțional. Replicarea specializată a plasmidelor în cursul transferului prin conjugare se face prin mecanismul „cercului rotativ” (Beale și Knowles, 1978). Conform ipotezei lui Jacob (1963), replicarea și segregarea plasmidelor și cromosomilor sînt corelate deoarece au situsuri de legare pe o membrană celulară comună. După Kline și Miller (1975), cromosomul bacterian și plasmidele F sînt legate mai degrabă prin ARN decît prin membrana celulară.

Fasmidele. Studiul experimental *in vivo* al replicării și expresiei genelor plasmidiale este dificil deoarece plasmidele există numai în fază intracelulară. Pentru a ocoli acest inconvenient a fost „construit” în laborator, cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant, un hibrid fag-plasmidă, numit *fasmidă* (engl. = phasmide — de la phage + plasmide; Kahn și Helinski, 1980), cu ajutorul căruia au fost lămurite numeroase aspecte ale acestor procese. S-a folosit în acest scop fagul *P4*, virus defectiv a cărui evoluție litică este dependentă de prezența în celula bacteriană a fagului ajutător („helper”) *P2* (în absența fagului *P2*, fagul *P4* nu produce lizină). Fasmida *P420* construită *in vitro* este o moleculă de ADN hibridă, alcătuită dintr-un segment de genom al fagului *P4* și un derivat cu masă moleculară mică al plasmidei *Col E1* numit *pMK 20* ($M \sim 2,8 \cdot 10^6$ dal). Fasmida poate fi ușor interconvertită între stările de fag și de plasmidă. Infecțarea unor celule de *E. coli* care poartă fagul ajutător *P2* în stare lizogenă cu fasmida *P420* este urmată de replicarea moleculei de ADN *P420* și de „împachetarea” ei în particule infecțioase de bacteriofagi. Infecțarea celulelor de *E. coli* nelizogene (fără fagul *P2*) are ca rezultat replicarea stabilă a plasmidei *P420* hibride, ca plasmidă (Six și Kwg 1973).

Controlul replicării plasmidelor. Novick (1980) atribuie o importanță esențială în replicarea plasmidelor situsului de inițiere a replicării

descrie ca o secvență cu o lungime de câteva sute de perechi de baze numită *originea replicării*. La nivelul său este situat situsul „start” al fiecărui ciclu de replicare, inițiat totdeauna la nivelul aceleiași perechi de baze. Restul regiunii conține probabil secvențe specifice la nivelul cărora aderă diferite proteine și poate alte molecule mari, care pot influența inițierea și replicarea ADN (fig. 32). Inițierea replicării este declanșată de o *proteină inițiator*, produs al genei *rep*. Inițiatorul are o funcție specifică, deoarece nu influențează replicarea unor plasmide diferite și este necesar pentru replicarea plasmidei omologe și *in vitro*.

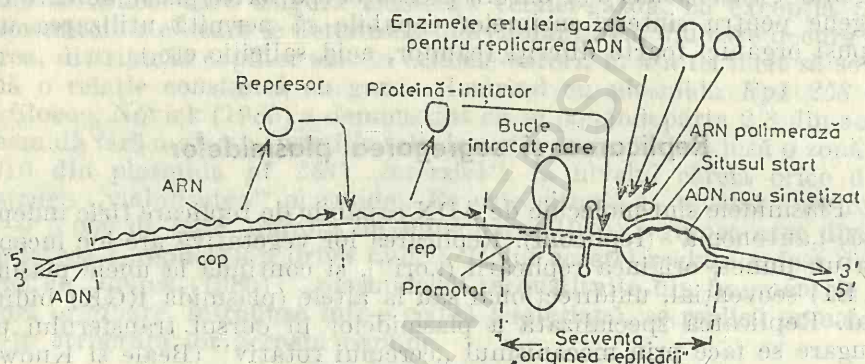


Fig. 32. — Modelul de reglare a replicării plasmidelor. Gena de replicare (*rep*), a cărei activitate este controlată de o proteină represor specificată de o genă de reglare *cop*, codifică o proteină-inițiator. Aceasta poate să recunoască „buclele” din cele două catene ale ADN plasmidial. „Buclele” se formează prin împerecherea intracatenară a bazelor cînd catenele sînt disociate pe măsură ce ARN polimeraza traversează secvența „origine”, începînd de la promotor, pentru a transcrie o moleculă de ARN ce va fi folosită ca amorsă („primer”) pentru replicarea ADN. Complexul rezultat (inițiator și bucle intracatenare) atrage o serie de enzime ale celulei-gazdă, inclusiv ADN polimeraza, adăugînd nucleotide noi moleculei de ARN primer (după Novick, 1980).

Primele etape în procesul de replicare a plasmidei sînt reprezentate de legarea și străbaterea secvenței de origine de către enzima ARN-polimeraza, sinteza de ARN „primer” care amorsează replicarea și separarea celor două catene ale ADN, permițînd să se formeze bucle intracatenare. Aceste bucle atrag probabil enzimele și alte proteine implicate în biosinteza de ADN nou. După Novick (1980), replicarea plasmidelor ar fi reglată independent de replicarea cromosomală și include obligatoriu intervenția unui sistem de reglare codificat de ele înșile. Aceasta explică de ce în cazul bacteriilor care poartă plasmide diferite fiecare poate avea un număr diferit per cromosom bacterian. Cel puțin în cazul anumitor plasmide ale *E. coli*, activitatea genei *rep* este controlată de o *proteină represor*, produs al genei *cop*, care controlează numărul copiilor fiecărei plasmide în celulă (fig. 32).

Represorul poate controla replicarea plasmidelor pe mai multe căi: 1) modificînd viteza de sinteză a proteinei inițiator; 2) influențînd viteza cu care inițiatorul interacționează cu originea sau frecvența cu care originea este transcrisă de ARN-polimerază etc. În felul acesta, replicarea plasmidelor s-ar găsi sub un control dublu: pozitiv, reprezentat de proteina-inițiator, și negativ, reprezentat de proteina-represor.

Multiplicitatea plasmidelor

Numărul plasmidelor de același tip într-o celulă bacteriană poate fi mic (1—2) sau ridicat (peste 50 de copii) și constant sau variabil, în funcție de tipul de control exercitat de cromosomul bacterian și respectiv de starea fiziologică a bacteriilor. În cazul în care plasmida este integrată în cromosomul bacterian, controlul este absolut: plasmida se replică odată cu cromosomul bacterian, comportându-se la fel ca determinanții genetici proprii acestuia. Plasmidele libere (fizic independente) sînt supuse unui control mai puțin riguros. Plasmidele relativ mari, R1, F1 cu $M \sim 62-65 \times 10^6$ dal, care posedă setul funcțional de gene necesare pentru conjugare și transfer (plasmide de tip conjugativ) sînt menținute într-un număr limitat de copii, 1—3 per cromosom bacterian, deoarece replicarea lor, cuplată cu aceea a cromosomului, este supusă unui control riguros („stringent”, Collins și Pritchard, 1973). În schimb, plasmidele mici, de tip neconjugativ (Col E 1 cu $M \sim 4,2 \cdot 10^6$ dal sau RSF 1030 cu $M \sim 5,6 \cdot 10^6$ dal), sînt menținute în număr mare ($\sim 10-15$ și respectiv $\sim 20-40$ de copii per cromosom), datorită unui control mai puțin eficient al replicării („relaxat”), care le menține însă în anumite limite. Numărul plasmidelor per cromosom bacterian este controlat deopotrivă de gene plasmidiale și bacteriene. Au fost descrise mutații la nivelul factorului R al *E. coli*, care mărește de 2—4 ori numărul plasmidelor (Nordström, 1972). Dovada controlului bacterian este furnizată de faptul că plasmida R prezintă la *E. coli* într-un singur exemplar, formează 12 copii dacă este transferată la *Proteus mirabilis* (Rownd, 1966). Este probabil că plasmidele prezente într-o singură copie pe celulă sînt legate de același situs membranar ca și cromosomul bacterian. Ca urmare, replicarea lor are loc sincron, iar diviziunea situsului membranal (mezosomul) asigură transmiterea la fiecare din celulele rezultate a unei copii de situs, a unui cromosom și a unei plasmide („control stringent”), ceea ce asigură transmiterea tuturor caracterelor fenotipice, indiferent de localizarea genelor respective pe componentii genomului celular. Plasmidele cu un număr mare de copii per celulă au situsuri de legare deosebite de cel cromosomal, ceea ce le asigură un grad mai mare de autonomie și un control mai „relaxat” al replicării.

Au fost propuse trei modele diferite pentru a explica acest tip de replicare, luînd ca exemplu o bacterie care ar conține 10 plasmide per cromosom: 1) după modelul „master copy”, dintre toate plasmidele una singură ar servi ca model și s-ar replica de 10 ori la fiecare replicare cromosomală, pentru a produce 20 de copii, care ulterior sînt repartizate egal (cîte zece) în fiecare din celulele rezultate din diviziune; 2) după modelul „democratic” în același caz, fiecare din cele 10 plasmide se replică odată la fiecare replicare cromosomală; 3) după modelul copierii aleatorii (Rownd, 1966), replicarea s-ar face la întimplare, în așa fel încît unele plasmide nu se replică deloc, altele o singură dată, iar altele de mai multe ori, formînd un „pool” de plasmide, din care în momentul diviziunii se face segregarea.

Eliminarea plasmidelor („Curing”)

Plasmidele pot fi eliminate spontan — sau cu o frecvență mărită — prin tratare cu anumite substanțe care interferă selectiv cu replicarea sau cu distribuția lor, fără a avea un efect echivalent asupra celulei-gazdă. Fiînd neesențiale pentru celula bacteriană, cel puțin în anumite condiții

de creștere, dispariția lor nu afectează viabilitatea acestora. Eliminarea spontană a plasmidelor s-ar datora fie unei discrepante între viteza replicării lor care ar fi încetinită în raport cu diviziunea celulară, fie unei anomalii de repartizare în celulele-surori.

Eliminarea și „vindecarea” celulei pot fi realizate mai eficient prin tratare cu acriflavină la pH 7,6, rifampicină, bromură de etidiu sau ioni de cobalt. Mecanismul de producere este încă necunoscut. Coloranții de acridină care elimină foarte eficient unele plasmide (ca de exemplu plasmida F; Hirota, 1960), fără să le afecteze pe altele (ca de exemplu plasmida R, Watanabe, 1966), acționează direct prin interferență selectivă cu replicarea plasmidei (Hohn, 1969). Detergentul dodecil sulfat de sodiu elimină unele plasmide printr-o acțiune indirectă, prin selecția variantelor spontane, selecționând clonele fără plasmide sau pe cele care poartă plasmide mutante (Salisbury, 1972). Alte substanțe tensioactive acționează prin distrugerea situsului membranelor de legare a plasmidelor sau prin interferență cu replicarea lui. Acțiunea selectivă a substanțelor respective ar fi condiționată de compoziția în baze a plasmidelor, ca și de structura lor fizică superhelică, deosebită de aceea a cromosomului bacterian.

Recombinarea plasmidelor

Recombinarea plasmidelor corespunde asocierii și legării cu diferite alte segmente de ADN, ducând în final la secvențe de gene recombinante (Beale și Knowles, 1978).

I. Recombinarea plasmidă—cromosom bacterian. Plasmidele cu funcții episomale. Integrarea ADN plasmidial în cromosomul bacterian și excizia lui reprezintă tipul cel mai mult studiat de recombinare a plasmidelor și seamănă ca mecanism cu acela al genomului fag ca profag.

Plasmidele cu funcții episomale se pot integra reversibil în cromosomul bacterian prin deschiderea ambelor structuri (plasmidă și cromosom), urmată de reunirea lor, prin extremitățile libere, într-o singură moleculă circulară. În acest caz, episomul nu se mai replică „autonom”, ci numai odată cu ceilalți determinanți genetici ai cromosomului în care a fost încorporat. Dovada existenței recombinării plasmidei F cu cromosomul bacterian o constituie prezența plasmidelor F' care poartă gene bacteriene (în urma unui proces de excizie eronată). Inserția plasmidei F în cromosomul bacterian pentru a forma bacterii de tip Hfr implică recombinarea între secvențele de inserție SI* care reprezintă regiuni omologe, atât în ADN bacterian (~17 SI), cât și în cel plasmidial (Sharp, 1972; Davidson, 1975).

II. Recombinarea plasmidă—plasmidă este controlată de genomul celulei-gazdă. A fost descrisă de Watanabe și Ogata (1966): plasmida R de la *S. typhimurium*, caracterizată prin prezența a patru gene de rezistență (la sulfamide, tetraciclină, streptomycină și cloramfenicol) și o foarte slabă capacitate de transfer, dă naștere, după ce a fost introdusă la *E. coli* F⁺ (care poartă plasmida F), unui nou tip de plasmidă care poartă aceleași gene de rezistență și are o mare capacitate de transfer. Noul tip

* Secvențele SI au fost numite originar astfel, nu datorită capacității lor de a insera plasmidele în ADN bacterian, ci din cauza proprietății lor de a se deplasa (transpoziție) pe cromosomul bacterian.

de plasmidă a luat naștere ca rezultat al recombinării determinantilor genetici de rezistență ai plasmidei de la *S. typhimurium* cu operonul de transfer al plasmidei de la *E. coli*. Datorită acestui fenomen, plasmidele reprezintă asamblări de fragmente de origini diferite și, ca urmare, nu pot fi considerate ca entități individualizate, decât în raport cu un anumit moment al existenței lor (Meynell și Richmond 1972). Ele au deci, cel puțin în anumite perioade ale existenței lor, o structură moleculară.

III. Plasmidele pot suferi diferite modificări structurale (disocierea în molecule componente) când sînt transferate de la o specie la alta, ca de exemplu prin transferul unei plasmide R de la *S. typhimurium* la *E. coli* (Anderson, 1965) sau de la *E. coli* la *Proteus mirabilis* (Rownd, 1975).

Fenomenul tipic în cazul plasmidelor cointegrate și al plasmidelor agregate poate fi inclus în categoria recombinării genetice, deoarece disocierea implică intervenția unor secvențe de inserție (SI) situate la diferite situsuri în structura ADN plasmidial (Hu, 1975; Beale, 1978).

Interacțiuni între plasmidele conjugative

Inhibarea fertilității

Watanabe (1964, 1971), precum și Meynell (1968) au observat că unele plasmide R comparabile nu modifică activitatea de transfer a plasmidelor F (notate fi^-) cînd coexistă cu acestea în aceeași celulă de *E. coli* ♂ (donor genetic). Foarte multe însă, reduc funcția de fertilitate a plasmidei F cu care coexistă — sînt fi^- — respectiv prezintă funcția de inhibare a fertilității („fertility inhibition”). Ca urmare, deci, există celule $F^+R^+fi^+$ a căror fertilitate (capacitate de conjugare) este mult redusă de prezența factorului R și celule $F^+R^+fi^-$ care transmit factorul F cu o frecvență ridicată. Fenomenul arată că anumite plasmide R și F prezintă un grad de înrudire mare, care face ca mecanismele lor de control să interacționeze.

Pe baza acestor observații a fost elaborat un model de control al fertilității în care, după Lewin (1977) și Willetts (1978), activitatea de inhibare a fertilității (fi^+) este determinată de produșii a doi cistroni, *fin O* și *fin P*, care acționează împreună pentru a inhiba exprimarea cistronului *tra j*. Acest cistron este prezent pe ambele plasmide și funcționează cu rol de reglare pentru exprimarea funcțiilor de fertilitate. El asigură exprimarea funcțiilor de fertilitate, cu excepția cazului în care cele două proteine, produse ale cistronului *fin O* și *fin P*, sînt legate simultan de el. Blocarea genei *tra j* stopează activitatea întregului operon de transfer, deoarece cistronii *tra* funcționează coordonat. Acest mecanism explică atât inhibarea fertilității plasmidei R, cît și pe aceea a plasmidei F.

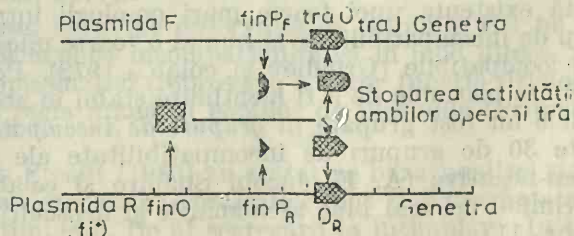


Fig. 33. — Modelul de reglare a exprimării plasmidelor F și R (după Lewin, 1977).

După Willetts (1978), marea fertilitate a plasmidelor F s-ar explica prin faptul că ele sînt mutante spontane *fin O*, deci incapabile să producă unul din componenții esențiali ai represorului (fig. 33).

Plasmidele R_{fi}^- , care nu au efect asupra capacității de transfer a plasmidei F, sînt de două tipuri. Primul tip este lipsit de capacitatea de a sintetiza proteine represor funcționale. Cel de al doilea tip poartă informația necesară pentru biosinteza unor pili de sex de tip special — pili I — similari celor produși de plasmida Col I. În felul acesta se creează un al doilea sistem de transfer integral diferit, care explică absența interacțiunii dintre cele două tipuri de plasmide.

Relațiile dintre plasmide

Numeroase observații au arătat că o plasmidă de sex nu poate infecta o celulă care conține o plasmidă de sex rezidentă în bacteria respectivă. Fenomenul a fost descris sub denumirea de „*imunitate de suprainfecție*” de Novick (1968), în experiențe care au demonstrat lipsa de eficiență a conjugărilor între două bacterii F^+ (σ), spre deosebire de cuplul $F^+ \times F^-$. În realitate, acest fenomen poate avea două explicații diferite (Bainbridge, 1980):

- 1) *Excluderea de suprafață* corespunde situației în care plasmida prezentă în bacterie determină apariția unor modificări ale suprafeței celulare, care creează o barieră fizică față de pătrunderea unei plasmide identice (Novick, 1968): în cazul bacteriilor F^+ , modificarea împiedică pătrunderea unei plasmide F identice. Bariera este specifică: dacă bacteria donatoare poartă două plasmide, A și B, iar receptorul numai plasmida A, excluderea se manifestă numai față de A.

- 2) Fenomenul de incompatibilitate a plasmidelor.

Compatibilitatea și incompatibilitatea plasmidelor

Observațiile referitoare la coexistența unor plasmide diferite în celula bacteriană au arătat că, în unele cazuri, prezența unei plasmide influențează acceptarea celei de-a doua: ca regulă generală, plasmidele diferite ca structură pot coexista în aceeași bacterie, sînt compatibile.

Incompatibilitatea corespunde situației în care, după pătrunderea în celulă, două plasmide omologe (omogene sau izogene) nu pot fi menținute stabil în aceeași bacterie, deoarece printr-un proces polarizat, una o exclude pe cealaltă, indiferent care este rezidentă și care este de suprainfecție.

Datele experimentale bazate pe tehnica hibridării ADN—ADN arată existența unei foarte mari omologii între plasmidele din același grup de incompatibilitate și numai o foarte mică asemănare între plasmidele compatibile (Grindley și colab., 1972). Pe baza incapacității unei anumite plasmide de a fi menținute stabil în aceeași celulă cu alta, plasmidele au fost grupate în *grupuri de incompatibilitate*. Au fost descrise peste 30 de grupuri de incompatibilitate ale plasmidelor la bacteriile Gram-negative (A. E. Jacob, Shapiro și colab., 1977), considerate ca exprimînd cel mai bine asemănările și deosebirile dintre plasmide (tabelul nr. 11).

Compatibilitatea și incompatibilitatea plasmidelor reprezintă în prezent unul dintre cele mai adecvate criterii de clasificare a lor.

Tabelul nr. 11

Exemple de grupuri de incompatibilitate la plasmidele bacteriene (după Novick și colab., 1976)

Grupul de incompatibilitate	Exemple de plasmide	Proprietăți
Inc F I	F, R 386	(Similare plasmidei de sex F)
Inc F II	R1, R 100	
Inc F III	Col B-K 98	
Inc F IV	R 124	
Inc A	R A-1	Diferite de plasmida de sex F
Inc I	Col I b-P9,	
	R 144	
Inc N	R 46	

În general, orice membru al unui grup de incompatibilitate nu poate coexista într-o celulă bacteriană cu oricare alt membru al aceluiași grup, dar poate coexista stabil cu orice membru al oricărui grup de incompatibilitate diferit. Uneori, în cazul infecției cu două plasmide de tipuri diferite, situația este variabilă, între coexistența stabilă și excludere. Ca regulă generală, se pare că cu cât două plasmide sînt mai apropiate evolutiv cu atât mai puțin pot coexista în aceeași bacterie.

Mecanismul fenomenului de incompatibilitate a plasmidelor. Bazele moleculare ale fenomenului de incompatibilitate sînt încă necunoscute. Au fost formulate mai multe ipoteze bazate pe fapte de observație care nu permit încă elaborarea unui model general univoc.

1) Studiind incompatibilitatea între plasmidele Col E1 la *E. coli*, Bedbrook și colab. (1979) au explicat-o ca decurgînd din competiția plasmidelor izogene pentru un număr limitat de situsuri de legare, care asigură segregarea dirijată în celulele-surori. Datele lor vin în sprijinul ipotezei repliconului (Jacob, Brenner și Cuzin, 1963), conform căreia la bacterii repliconii sînt legați de situsuri membranare specifice, care joacă rol important în replicare, segregare și transfer prin conjugare. Plasmidele omologe s-ar lega de același situs membranar în celulă, în timp ce plasmidele diferite s-ar asocia cu situsuri diferite, dar specifice pentru fiecare dintre ele (Novick, 1968; Helinski, 1977).

2) Al doilea mecanism bazat pe observația că tulpinile Hfr nu pot purta o plasmidă F liberă explică incompatibilitatea în mod direct, prin acțiunea unor factori citoplasmatici (represori), a căror funcție fiziologică efectivă ar fi aceea de a regla numărul copiilor de plasmide (Pritchard, 1969).

3) Novick și Hoppen-Steadt (1980) au arătat pe baza analizei statistice că fenomenul este pur stocastic: rezultatele pot fi interpretate fie ca efectul replicării la întîmplare, fie al segregării la întîmplare. În timp ce plasmidele neînrudite, compatibile, pot fi menținute indefinit în aceeași

bacterie, plasmidele incompatibile se replică la întâmplare, iar segregarea lor, în momentul diviziunii, în celulele-surori se face la întâmplare. Datorită asemănării lor ele nu pot fi recunoscute ca diferite de sistemele celulare și plasmidiale care reglează replicarea și segregarea (Novick, 1980), în așa fel încît, în final, se ajunge la obținerea de celule care conțin un singur tip de plasmide (fig. 34).

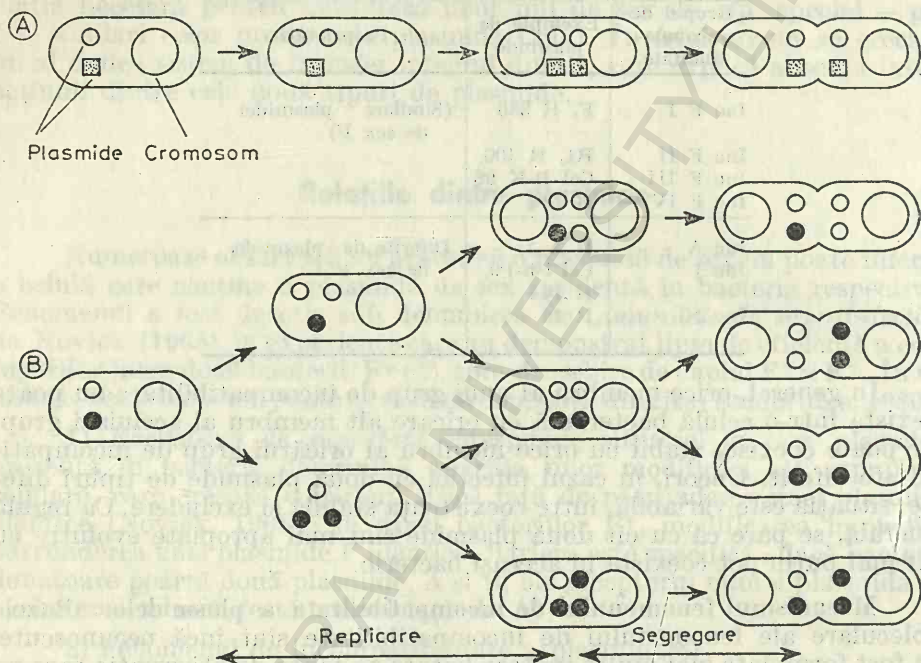


Fig. 34. — Replicarea și segregarea plasmidelor compatibile în contrast cu cele incompatibile. A. Plasmidele neînrudite — „compatibile” — pot fi menținute împreună în celulă. Ele se replică în diferite stadii ale ciclului celular, iar copiile lor sînt repartizate în mod egal în cursul diviziunii celulare. B. Plasmidele strins înrudite — „incompatibile” — se replică aleatoriu, cînd una cînd alta, și sînt repartizate la întîmplare în momentul diviziunii. Copiile „surori” nu sînt totdeauna separate una de alta. Rezultă linii celulare care poartă fie o plasmidă, fie alta (după Novick, 1980).

Incompatibilitatea este interpretată ca indicînd o interrelație strînsă și eventual o origine evolutivă comună. Invers, cu cît sînt mai diferite, plasmidele se tolerează, „se ignoră” reciproc, cînd se găsesc în aceeași bacterie. Contrastul dintre compatibilitate și incompatibilitate indică un înalt grad de specificitate în interacțiunile dintre celula bacteriană și plasmide. Determinanții genetici specifici plasmidiali au un rol important în comportarea diferită a plasmidelor compatibile și incompatibile.

Natura și originea plasmidelor

Plasmidele sînt considerate de unii autori, ca „paraziți” independenți sau parțial dependenți, care folosesc bacteriile ca nișe ecologice convenabile, puțin să se deplaseze, cu mare ușurință, de la o bacterie la alta. Ele

ar fi la origine, elemente străine pentru celulele care le adăpostesc. Inițial invadatoare, ca și virusurile, ar fi devenit treptat, printr-o serie de mici etape evolutive, locuitori naturali ai „comunității” intracelulare. După alți autori, ele ar putea fi considerate ca resturi de ADN („flotsam and jetsam”) care „înoată” în lumea bacteriană, fiind capabile să devină alternativ legate sau separate de numeroase alte molecule de ADN și avînd proprietatea esențială de a-și păstra individualitatea, prin determinarea structurii plasmidelor progene.

Davis (1979) consideră că plasmidele ar fi apărut din necesitatea de a apăra bacteriile producătoare de antibiotice de proprii lor produși. Astfel, *Bacillus circulans* sintetizează o enzimă care inactivează atît antibioticul aminoglicozidic, butirozina, pe care îl sintetizează în cursul metabolismului său, cît și unele antibiotice înrudite, cum este neomicina.

Novick (1980) consideră că plasmidele ar fi apărut inițial la bacteriile din sol sub forma unor gene de rezistență situate la început fie pe plasmide, fie pe cromosomi, ca răspuns față de prezența în sol a diferite antibiotice și metale grele toxice. Ele au trecut apoi la bacterii care produc infecții la animale. Dovada ar fi faptul că au fost găsite bacterii vii autohtone din sol capabile să elaboreze penicilinază sau purtînd plasmide de rezistență la tetracilină, kanamicină ș.a. Aplicarea pe scară largă a antibioticelor în medicină și zootehnie a dezechilibrat un foarte vechi și stabil ecosistem, în care se realizase un echilibru între producătorii de antibiotice și microorganismele-țintă, cu gene de rezistență.

În ceea ce privește originea lor actuală, evidențierea plasmidelor de rezistență la antibiotice (streptomycină, tetracilină, bluensomicină) la tulpini de *E. coli*, izolate în anul 1937, de la bolnavi și păstrate în stare liofilizată din anul 1946, deci anterior descoperirii și introducerii în practică a antibioticelor respective, demonstrează că plasmidele R nu au apărut *de novo*, ca răspuns la expunerea bacteriilor la chimioterapice (Smith, 1967; Hahn, 1979). Chimiorezistența s-a răspîndit însă ca rezultat al selecției produsă de antibiotice în spitale și în colectivități cu control medical inadecvat, sau prin intermediul animalelor tratate cu antibiotice furajere (Swann, 1969).

Pornind de la o concepție personală, după care orice acid nucleic care își controlează propria replicare este un organism, Novick (1980) consideră plasmidele ca organisme independente, membri ai unei ierarhii de viață subcelulară. Ele s-ar deosebi de virusurile care omoară celulele-gazdă (poliovirus, fag T4 etc.) și de cele capabile să omoare, dar și să coexiste stabil (fagii temperați, unele virusuri animale), prin calitatea de endosimbionți. Datorită acestui fapt, plasmidele pot exista stabil în celula-gazdă, furnizindu-i funcții genetice adaptative și aducîndu-i servicii. Este evident că a considera unele molecule nude de ADN ca organisme este o exagerare, greu de pus în acord cu conceptul de viață, bazat — aproape în unanimitate — pe interacțiunile acizi nucleici — proteine și pe organizarea de tip celular*.

* vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 256.

Evoluția plasmidelor

Structura genetică a tuturor celulelor procariote pare să implice prezența unui număr de „pool”-uri genetice interpenetrante, care sînt organizate ca repliconi, adică „supraviețuiesc” în celulă sub forma unor structuri ce se replică autonom și a căror replicare este ajustată la rata de diviziune a celulei. Genele cu semnificație ecologică înrudită (deși cu consecințe biochimice diferite) au tendința să se acumuleze pe repliconi unici, în timp ce acelea care nu sînt necesare în anumite condiții de creștere pot fi „pierdute” din celulă. În același timp, în condiții de mediu modificate, în celula bacteriană se pot stabili, prin transfer, noi repliconi care se adaugă conținutului genetic de bază. În acest cadru, genele necesare pentru ca celula să supraviețuiască, indiferent de condițiile de mediu (genele pentru metabolism biosintetic și producător de energie, creștere și diviziune etc.), se grupează pe un replicon mare, esențial, cromosomul bacterian. Celelalte gene a căror activitate tinde să reflecte aspecte de detaliu ale mediului, la care bacteria trebuie să se adapteze la un moment dat, se grupează pe repliconi accesorii sau plasmide. Unele dintre aceste gene, cele care sînt necesare cel mai „continuu”, pot avea tendința să se unească cu genele esențiale, pe repliconul cel mai persistent, adică pe cromosomul bacterian (care este relativ stabil ca structură chimică, deși poate fi modificat prin adiții, deleții etc.), în timp ce altele pot părăsi acest replicon, pentru a se organiza în repliconi extracromosomalii (plasmide). Urmată într-o perioadă îndelungată de timp, distribuția genelor între cromosom și plasmide variază, probabil, ca răspuns la modificările de mediu. În consecință, celula procariotă se găsește într-o stare de flux genetic continuu (nu atât datorită mutațiilor — deși le revine și lor o parte din apariția diferitelor variații), cît mai ales datorită adăugării, pierderii și reasortării genelor între diferiți repliconi (Richmond, 1970; Richmond și Wiedeman, 1974); fapt care îi conferă o mare putere de adaptare la modificările de mediu.

Această flexibilitate genetică demonstrată la bacteriile enterice — dar probabil existentă la toate celulele procariote — are consecințe foarte importante pentru taxonomie. În funcție de „libertatea” schimbului de material genetic, care poate avea loc între două bacterii, depinde măsura în care unele bacterii „cad” într-o specie sau în alta. Spre deosebire de cromosomul bacterian, care formează „genomul individual” stabil, plasmidele care conferă bacteriilor o serie de proprietăți metabolice adiționale, a căror identificare este departe de a fi stabilită, deoarece este larg răspîdită în populațiile bacteriene și totodată ușor transmisibilă, ar constitui un fel de „genom colectiv” (Cornelis, 1982). Rațiunea existenței acestei dualități a genomului bacterian rezidă, foarte probabil, în necesitatea de a cumula stabilitatea și capacitatea de adaptare a bacteriilor: cromosomul ar asigura evoluția lentă, iar plasmidele pe cea rapidă.

Semnificația biologică a plasmidelor

Dobindirea unei plasmide de către o celulă bacteriană echivalează cu primirea unui bloc de material genetic, corespunzător, în unele cazuri, cu circa 6—10 gene. De aceea, se apreciază că prezența plasmidelor este

beneficială pentru bacteriile purtătoare, care pot avea unele avantaje metabolice, o mai bună capacitate de adaptare și de rezistență la condiții în mod normal adverse și de aici posibilitatea de a înlocui bacteriile normale, rezidente într-un anumit mediu. Datorită acestui fapt, unii cercetători le consideră adevărați mici cromosomi supranumerari, care fac parte din stocul de gene „vital” pentru o specie dată. Plasmidele joacă un rol important în variabilitatea bacteriilor, mai ales în raport cu mutațiile, care cel mai adesea duc la pierderea unui caracter și sînt de obicei dăunătoare, cel puțin în primul moment după apariția lor, deoarece celulele mutante se divid, de regulă, mai lent și se pierd în masa mare de celule normale.

Semnificația biologică a plasmidelor este amplificată de capacitatea unora dintre ele de a fi transmisibile de la o celulă la alta, de a se comporta ca factori determinanți ai conjugării (conjugoni) sau de a suferi procese de integrare reversibilă și excizie din cromosomul bacterian, determinînd asocierea și disocierea unor repliconi diferiți. Acest rol este cu atît mai important cu cît experimental s-a demonstrat posibilitatea de transfer a plasmidelor prin transformare genetică și conjugare între specii

Tabelul nr. 12

Spectrul de gazde al unor plasmide conjugative* (după Reanney, Cowland și Slater, 1933)

Grupul de incompatibilitate	Reprezentantul tipic	Spectrul de gazde (genuri de bacterii)
Inc C	R40 a	<i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i>
Inc N	R390	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>
Inc P	RP1	<i>Acinetobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i>
Inc Q	R300 B	<i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i>

* Spectrul de gazde indică genurile în tulpinile cărora s-a demonstrat prezența și posibilitatea de transfer a plasmidelor din grupurile *Inc* respective. Plasmidele reprezentative nu colonizează obligatoriu toate genurile înscrise în dreptul lor.

și chiar genuri diferite (tabelul nr. 12). Aceasta demonstrează, pe de o parte, faptul că actualele criterii taxonomice nu sînt adecvate pentru a defini spectrul de schimb genetic interbacterian al plasmidelor, iar, pe de

alta, posibilitatea de răspîndire extensivă a plasmidelor în natură între organisme considerate convențional ca diferite (fig. 35).

Plasmidele contribuie la implantarea bacteriilor patogene în organism, fie conferindu-le o rezistență multiplă la antibiotice, fie mărindu-le virulența și patogenitatea prin introducerea unor determinanți genetici de virulență (ex. plasmida Col V la *E. coli*) sau de toxigeneză (plasmidele *Ent* pentru enterotoxină și *Hly*, pentru hemolizină ale *E. coli*) (Helinski, 1979).

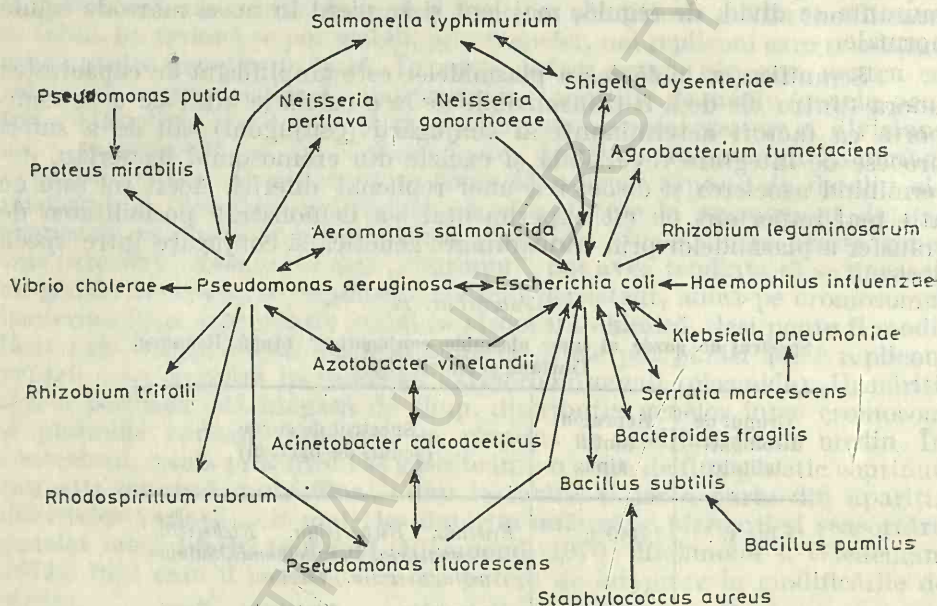


Fig. 35. — Răspîndirea extensivă a plasmidelor prin transformare genetică și conjugare. Săgețile indică fluxul informației genetice de la celulele donatoare la cele receptoare (după Young și Mayer, 1979).

Este bine cunoscută existența unui control genetic la nivel celular, reprezentat de faptul că unele gene cromosomale nu sînt active decît în medii în care funcția lor este necesară, ca rezultat al trecerii alternative a genelor lor de la starea de „stop” la starea de „start”. În mod similar, în mediile naturale, cînd plasmidele sînt prezente numai în cîteva celule dintr-o populație, ele se vor replica numai în acele celule rare. În schimb, cînd condițiile modificate de mediu impun funcționarea lor, ele se transmit rapid la toate celulele din populația respectivă. În plus, transferul unora din genele lor pe plasmide diferite și posibilitatea acestora de a fi purtate de celule diferite din populația bacteriană crește enorm numărul total de gene și amplifică proprietățile metabolice globale ale speciei. În felul acesta, controlului celular individual, i se adaugă un control lărgit, la nivel populațional, consecutiv activității genelor dispersate pe diferite plasmide. Unele plasmide au un spectru de gazde foarte limitat, în timp ce altele pot fi menținute stabil într-o largă varietate de celule bacteriene.

Utilizând date din literatură, Reanney (1976) a arătat că datorită spectrului larg de gazde ale plasmidelor conjugative (tabelul nr. 12) și al anumitor fagi, genele care codifică diferite particularități biochimice specializate, absente din cromosomul bacterian, pot fi introduse în celulele bacteriene prin intermediul acestora (fig. 36).

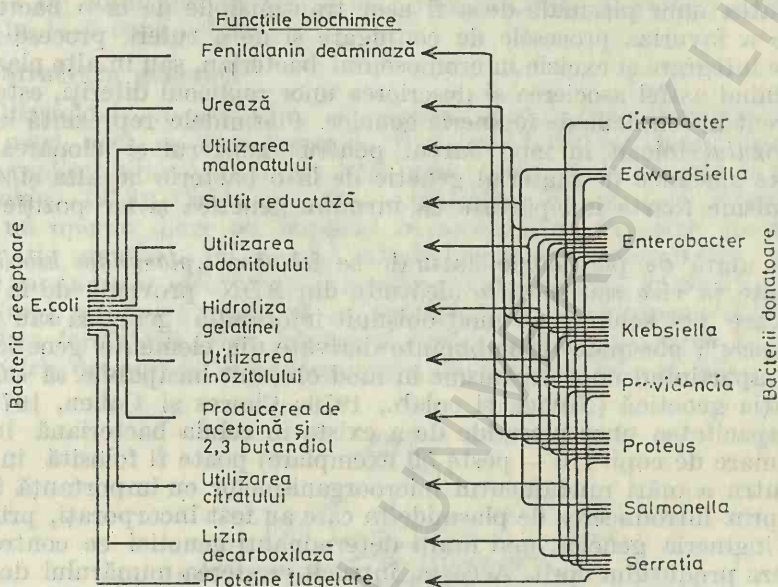


Fig. 36. — Genele care codifică o serie de produși, absente din cromosomul *E. coli* pot proveni de la exterior, respectiv de la alte specii sau alte genuri. Datele prezentate se bazează pe transferuri de gene demonstrate în condiții experimentale de laborator (după Reanney, 1976).

Consecința pe plan biologic general este că în orice ecosistem, mărirea entității asupra căreia acționează selecția, depășește cu câteva ordine de mărime dimensiunile setului de gene caracteristic unei populații monoclonale de *E. coli*, cultivată în laborator. Cu ajutorul plasmidelor și fagilor, bacteriile realizează un răspuns adaptativ la condițiile schimbătoare din diferitele micromedii. În acest cadru, selecția poate menține un grad înalt de variație genetică dispersată, cu un preț metabolic minimal. Totodată, în acest fel, genomul *E. coli* rămâne suficient de mic pentru a asigura bacteriei avantajele legate de viteza mare cu care are loc diviziunea. Fenomenul are probabil caracter de generalitate. Sonea (1976, 1980), într-o variantă modernă a pleomorfismului, consideră că datorită prezenței plasmidelor, bacteriile pot fi considerate ca formînd o clonă unică de tip superior pe Terra, un superorganism, alcătuit din celule care posedă același genom potențial. Ele ar fi expuse unei redistribuiri permanente de gene, printr-un schimb, care tinde să aducă în fiecare nișă ecologică cea mai convenabilă combinație de gene. În felul acesta, lumea bacteriilor ar forma o entitate globală, planetară, ai cărei membri, genetic și funcțional solidari, ar reprezenta o lume unificată printr-o organizare și prin funcții de natură superioară (Sonea și Panisset, 1980).

Utilizări practice ale plasmidelor

Unele plasmide naturale găsite la *E. coli*, ca și la alte bacterii au un spectru de gazde foarte limitat, în timp ce altele (grupul P1) pot fi menținute stabil într-o largă varietate de bacterii diferite (Helinski, 1979). Capacitatea unor plasmide de a fi ușor transmisibile de la o bacterie la alta, de a favoriza procesele de conjugare și de a suferi procese reversibile de integrare și excizie în cromosomul bacterian, sau în alte plasmide, determinând astfel asocierea și descrierea unor repliconi diferiți, este folosită curent în tehnicile de ingineria genelor. Plasmidele reprezintă *vectorul* sau *vehiculul* folosit în mod curent pentru transferul și clonarea unor segmente specifice de material genetic de la o bacterie la alta și/sau de la organisme foarte îndepărtate ca înrudire genetică și ca poziție sistematică.

În afară de plasmidele naturale se folosesc „*plasmide hibride*” — constituite *in vivo* sau *in vitro* alcătuite din ADN provenit de la organisme care pot schimba în mod obișnuit informația genetică sau „*plasmide chimere*”, plasmide recombinante derivate din elemente genetice parentale, aparținând unor organisme în mod obișnuit incapabile să schimbe informația genetică (Novick și colab., 1976; Clowes și Cohen, 1979).

Capacitatea unor plasmide de a exista în celula bacteriană într-un număr mare de copii (10 — peste 50 exemplare) poate fi folosită în practică pentru a mări randamentul microorganismelor cu importanță industrială, prin introducerea de plasmide în care au fost încorporați, prin tehnici de ingineria genelor, mai mulți determinanți genetici ce controlează biosinteza produsului dorit. Aceasta, întrucât creșterea numărului de copii al unor gene determină în mod normal creșterea producției proteinei specifice genelor respective. Astfel, în mod normal, nivelul indus al catalazei la *Rhodospseudomonas sphaeroides* este de 1% din proteina celulară, în timp ce în unele celule care conțineau copii multiple ale genelor structurale care codifică enzima, aceasta reprezintă ~ 25% din proteina celulară (Clayton și Smith, 1977). În mod similar, producția de β -galactozidază și de *aspartat transearbamilază* (Gerhart și Holoubek, 1972) la *E. coli* a crescut prin transferul suplimentar al unei plasmide care conținea genele structurale respective (Demain, 1972, 1979).

Plasmidele F

Plasmidele F (engl. „fertility”), cunoscute și sub denumirea de plasmide de sex, sînt unități genetice extracromosomale cu proprietăți episomale și funcție de conjugon, avînd structura de molecule de ADN dublu helicale, circulare închise, cu o lungime medie de ~ 30,8—31,7 μ m. Prototipul plasmidelor de sex este cea descrisă la *E. coli K12* (Hayes, 1968), prezentă în mod obișnuit într-un singur exemplar în fiecare celulă bacteriană, datorită sincronizării replicării sale cu aceea a cromosomului bacterian.

După Birge (1981), numărul plasmidelor F este greu de apreciat corect. El ar fi în medie de $\sim 1,5 \pm 0,5$ per cromosom, dar rațional

este de așteptat să fie mai mare, deoarece, datorită dimensiunilor lor, plasmidele F se pot replica mai repede. Ele au în medie $\sim 94,5 \times 10^3$ baze, ceea ce corespunde la $\sim 1,44 \times 10^6$ dal. Deci, sînt considerabil mai mici decît cromosomul bacterian cu dimensiuni medii, care are $\sim 4,1 \times 10^6$ baze și respectiv $6,23 \times 10^9$ dal). Acest punct de vedere pare să fie confirmat de faptul că unele plasmide F au fost găsite prezente în 4—6 copii/celulă.

Structura genetică

Plasmidele de sex sînt, în general, unități genetice extracromosomale mari, ceea ce demonstrează că procesul de conjugare bacteriană este complicat și necesită intervenția unui număr mare de gene și proteine (Achtman, 1978). Harta genetică a plasmidei F a *E. coli* cuprinde, pe lîngă un operon mare *tra* implicat în procesul de transfer conjugal de informație genetică, un număr relativ mare de determinanți genetici, dintre care au fost identificați și localizați numai cîțiva, implicați în replicare (*rep*), originea replicării în transfer (*ori*), incompatibilitate (*inc*), inhibarea fertilității (*fin*), inhibarea fagilor (*phi*), imunitatea la zigozisul letal (*ilz*), precum și cîteva secvențe de inserție (SI2 și SI3) (fig. 37).

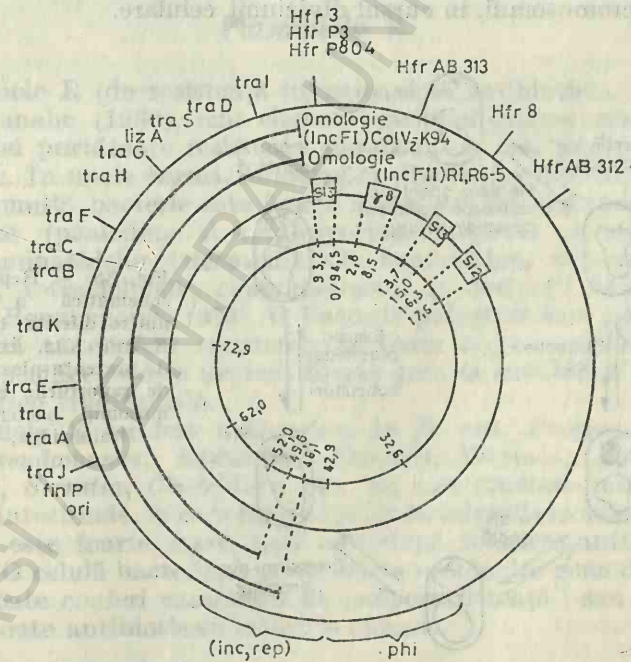


Fig. 37. — Harta genetică a plasmidei F. Cercul intern prezintă unele coordonate fizice, în Kb, iar cel alăturat, localizarea SI identificate. Cele două arcuri de cerc prezintă zonele de omologie cu alte plasmide. Cercul extern indică localizarea unor cistroni implicați în inhibarea fagilor (*phi*), incompatibilitate (*inc*), replicare (*rep*), transfer (*tra*), inhibarea fertilității (*fin*) etc. Este reprezentată originea replicării pentru transfer (*ori*) și pozițiile la care SI de pe F se recombina cu cromosomul bacterian pentru a produce tulpini Hfr (după Bukhari și colab., 1979).

Plasmida F are o regiune amplă, corespunzând operonului *tra*, de omologie genetică cu unele plasmide Col și R cu funcție de conjugon.

Plasmida F a *E. coli* conține o porțiune reprezentând ~ 10% din mărimea sa, deosebită de oricare din gazdele sale, cu G + C 44%, și alta, reprezentând ~ 90%, cu G + C 50%, respectiv identică cu cea a cromosomului bacteriei-gază naturală. Aproximativ jumătate din această ultimă porțiune hibridează cu ADN cromosomal al *E. coli*, ceea ce demonstrează existența unei foarte mari omologii în secvența de baze. Această particularitate sugerează posibilitatea ca plasmidele de sex să conțină anumite gene, care la origine au făcut parte din cromosomul bacterian, din care s-au desprins în cursul evoluției și de care în prezent celula bacteriană se poate dispensa. Deși plasmidele F se replică autonom, ele se găsesc într-o strînsă asocierie spațială cu cromosomul bacterian, prezent sub forma unor anse mari, superhelicale, menținute de ARN și proteine. Datorită structurii sale superhelicale, plasmida F seamănă cu o buclă cromosomală. După liza blîndă cu detergenți a celulelor de *E. coli* F^+ , plasmidele F sînt găsite „încurcate” printre fibrilele de ADN cromosomal eliberat. După Birge (1981), asocierea plasmidei F superhelicale cu cromosomul bacterian nu are la bază criterii de specificitate, ci ar reprezenta un aranjament avantajos pentru segregarea automată a plasmidei F, odată cu cromosomul, în cursul diviziunii celulare.

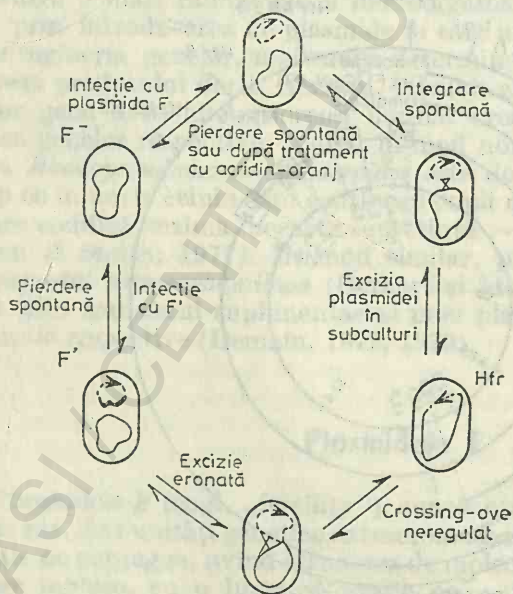


Fig. 38. — Reprezentarea schematică a relațiilor dintre diferite tulpini de *E. coli* K12, condiționate de prezența plasmidei F și de raporturile ei cu cromosomul bacterian (după Brainbridge, 1980).

În funcție de prezența plasmidelor de sex F, de raportul lor cu cromosomul bacterian și de modul în care facilitează transferul de material genetic, bacteriile se pot grupa în patru categorii distincte (fig. 38):

1) *Bacteriile F^-* , lipsite de factorul F, echivalente unor celule femele, care se comportă ca receptoare de material genetic.

2) *Bacteriile* F^+ , avînd plasmide F autonome în citoplasmă, echivalente unor celule masculine sau donatoare de material genetic, respectiv capabile să transmită plasmida F .

3) *Bacteriile* Hfr („High frequency of recombination” = cu mare frecvență de recombinare), posedînd o plasmidă F integrată în cromosomul bacterian, considerate ca avînd un caracter de supermascul, deoarece se comportă ca donatoare de material genetic, caracterizate printr-o mare frecvență de conjugare și recombinare. Prezența plasmidei F integrate determină de obicei transferul unui număr variabil de gene cromosomale, de unde marea frecvență a recombinației acestui material genetic cu genomul celulei receptoare și numai foarte rar transferul factorului F însuși care este situat la extremitatea distală a cromosomului angajat în transfer.

4) *Bacteriile* F' purtătoare ale unei plasmide de tip special (factor de fertilitate recombinant) care a încorporat în structura sa și unele gene din cromosomul bacterian în care a fost inițial integrată și din care a trecut în stare autonomă printr-un proces de excizie eronată. Astfel de bacterii au, de asemenea, caracter de mascul și se comportă ca donatoare de material genetic reprezentat de factorul F' .

Plasmidele R

Plasmidele R (de rezistență infecțioasă la antibiotice), descrise inițial de Watanabe (1960), sînt elemente genetice extracromosomale, care conferă celulei purtătoare rezistența simultană la mai multe antibiotice, sulfamide etc. În unele cazuri, numărul antibioticelor devenite ineficiente față de o anumită bacterie este foarte mare, putînd cuprinde ansamblul β -lactaminelor (peniciline și cefalosporine, naturale și semisintetice), ansamblul aminazidelor (streptomicină, kanamicină, neomicină, gentamicină etc.), tetraciclinele, cloramfenicolul și derivații săi, precum și sulfamidele (Bouanchaud, 1973). O bacterie patogenă care poartă o plasmidă capabilă să confere rezistența la toate aceste antibiotice — prin mecanisme specifice — este evident foarte greu de combătut prin mijloacele terapeutice tradiționale.

Plasmidele R au fost evidențiate la *E. coli*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Clostridium* etc. Au fost studiate însă, în special la bacteriile intestinale, la care frecvența lor la tulpinile izolate din anumite colectivități este foarte mare, mai ales după folosirea antibioticelor în terapeutică. O celulă bacteriană poate purta mai multe gene de rezistență, ceea ce îi poate conferi caracterul de „superrezistență” sau chiar de rezistență la toate antibioticele utilizate curent.

Structura moleculară

Plasmidele R se prezintă fie sub forma unor molecule de ADN dublu catenare, circulare închise și răsucite în formă superhelică („supercoiled”), fie sub forma unor molecule dublu catenare, circulare, avînd o breșă pe una din catene („nicked duplex loop”). Masa lor moleculară oscilează între $1 \cdot 10^6$ — $1 \cdot 10^8$ daltoni (1—100 Mdal), (Clowes, 1973), deci

între limite aproape de același ordin, ca în cazul ADN fagic. După Helinski (1973), cele mai mari plasmide R au $\sim 26-76 \times 10^6$ dal. Aceste diferențe s-ar putea datora faptului că plasmidele mari pot fi greu izolate ca molecule circulare întregi. Ele sînt expuse fragmentării, datorită sensibilității la rupere fizică sau prin apariția de breșe monocatenare, catalizate de endonucleaze și clivare dublu catenară („chopping”), care pot apărea în cursul extracției. În general, plasmidele R ale bacteriilor Gram-negative sînt mai mari decît cele ale bacteriilor Gram-pozitive și pot să conțină pînă la 100 gene sau chiar mai multe.

Unele plasmide R sînt instabile și pot fi eliminate spontan, dacă presiunea selecției exercitată de antibiotice diminuează sau dispare, în timp ce altele (cele de la *Pseudomonas*) sînt foarte stabile, comportîndu-se ca parte integrantă a „mașinăriei” biochimice a celulei bacteriene. Plasmidele R sînt prezente totdeauna în număr mic în celula bacteriană (rar mai mult de 1-2 per cromosom).

În culturi pure, prezența plasmidei R nu are un efect detectabil asupra celulelor-gază. În culturi mixte prelungite însă, apar diferențe mici, dar reproductibile, care favorizează multiplicarea *E. coli* R^- (lipsită de plasmida R), comparativ cu celulele R^+ , care o posedă (Alldrick și Smith, 1983). Spre deosebire de plasmidele F, plasmidele R nu se integrează în cromosomul bacterian pentru a forma celule Hfr. Cu toate acestea, unele plasmide R au capacitatea de a „mobiliza” — printr-un mecanism încă neclarificat — gene cromosomale și de a le transfera, ocazional, cu o frecvență joasă, la alte bacterii (Meynell, 1972).

Structura genetică

Plasmidele R au o structură genetică complexă și sînt alcătuite, în esență, din două regiuni funcționale, genetic distincte: 1) genele care asigură proprietatea de rezistență la antibiotice (reprezentînd determinanții „r” sau „det -r”) și 2) genele care conferă funcția de conjugon sau de transferon, formînd așa-numitul „factor de transfer” al rezistenței („FTR”), ce asigură capacitatea de replicare autonomă și de transfer sexual prin conjugare. Cele două tipuri de elemente „r” și „FTR” pot exista independent în celula bacteriană sau se pot asocia într-un complex FTR-r, care corespunde plasmidei R cu rol de conjugon. Asocierea este reversibilă și fiecare din cele două elemente poate fi pierdut din celulă prin segregare. Gradul de asociere și stabilitatea complexului depind de proprietățile fiecărui factor R individual și de cele ale bacteriei-gază.

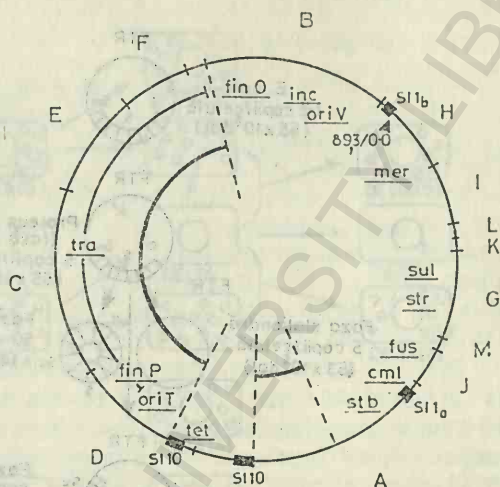
Fig. 39 prezintă harta genetică a plasmidei *R 100* (sinonim *NR1* sau *R 222*), izolată inițial de la *S. dysenteriae*. Ea conține integrat într-o structură fizică și genetică unitară, cu masa moleculară ~ 70 Mdal, un operon de transfer (avînd regiuni importante de omologie cu plasmida F), patru secvențe de inserție (2 SI1 și 2 SI2), precum și determinanții genetici care conferă rezistență la 100 $\mu\text{g/ml}$ tetraciclina (*tet*), 200 $\mu\text{g/ml}$ cloramfenicol (*com*), 12,5 $\mu\text{g/ml}$ streptomycină (*str*) și 200 $\mu\text{g/ml}$ sulfonamidă (*sol*).

Plasmidele cointegrate

Studiul unor plasmide R ca *R 222* (*R 100*, *NR1*), *R1*, *P6* etc. a arătat că la *E. coli* ele se găsesc sub forma unor molecule unice de ADN

cu $M \sim 70 \times 10^6$, $\sim 65 \times 10^6$ și respectiv $\sim 64 \times 10^6$ (Cohen, 1970). Dacă sînt transmise la *Proteus mirabilis*, fiecare din aceste plasmide se disociază în două unități distincte de ADN circular, corespunzînd facto-

Fig. 39. — Harta genetică a plasmidei *R 100* (*R 222*) cu menționarea poziției secvențelor de inserție, a fragmentelor de restricție *Eco R1* (literele majuscule exterioare), a originii transferului (*ori T*) și a replicării vegetative (*ori V*). Genele de transfer (*tra*) sînt marcate printr-un arc. Harta prezintă poziția genelor de rezistență la tetraciclină (*tet*), cloramfenicol (*cml*), acid fusidic (*fus*), streptomycină (*str*), sulfamidă (*sul*), ioni de mercur (*mer*). Linia groasă semicirculară internă marchează regiunea care este $\sim 90\%$ omologă cu plasmida *F* (după Dempsey și McIntire, 1979).



ului de transfer al rezistenței (FTR) și respectiv determinanților genetici ai rezistenței (*r*). În cazul plasmidei *R 222*, în timp ce la *E. coli* se evidențiază o singură plasmidă, avînd ~ 70 Mdal, la *Pr. mirabilis* se evidențiază trei tipuri de molecule avînd ~ 70 Mdal, ~ 58 Mdal, corespunzînd factorului de transfer, și ~ 12 Mdal, corespunzînd genelor de rezistență la patru antibiotice (fig. 40, 41).

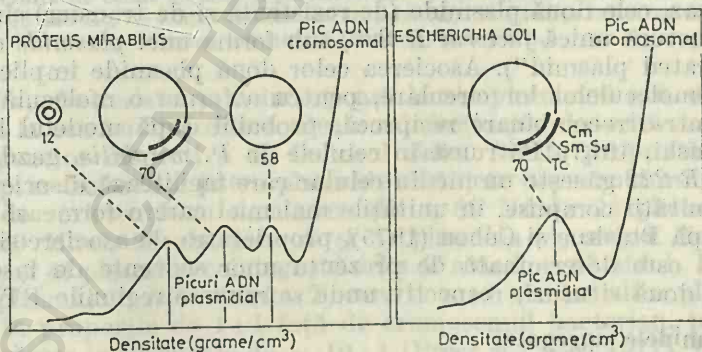


Fig. 40. — Comportarea plasmidei *R 222* în *Proteus mirabilis* și *E. coli*. În *Proteus* apar trei picuri, corespunzînd, fiecare, unei plasmide diferite: 12 Mdal (rezistență la patru antibiotice), 58 Mdal (factorul de transfer) și 70 Mdal (plasmida cointegrată). La *E. coli*, cele două plasmide mici sînt totdeauna cointegrate într-o moleculă de 70 Mdal.

Aceste observații (Nisioki, Mitani și Clowes, 1969; Cohen și Miller, 1970) au dus la concluzia că cel puțin unele plasmide *R* sînt formate din unirea covalentă a două specii de ADN, care se pot replica independent: una formînd plasmida de transfer (FTR), iar cealaltă plasmida de rezis-

tență (r). În celulele de *E. coli* care reprezintă probabil gazda naturală a celor două plasmide, ele se reunesc într-o specie moleculară unică ($M \sim 70$ Mdal), ce poartă atât funcțiile de transfer, cât și pe cele de rezistență.

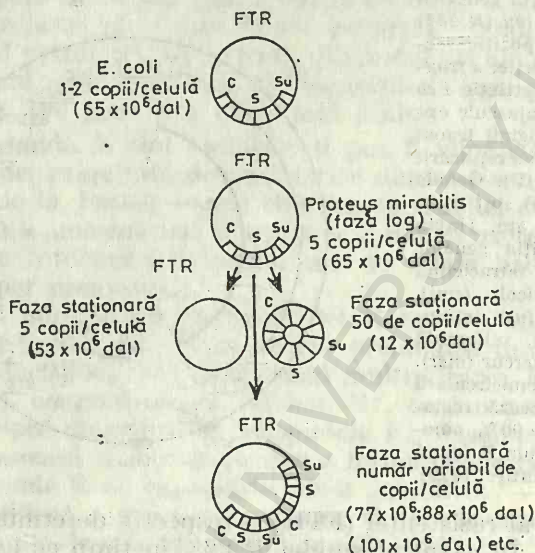


Fig. 41. — Reprezentarea schematică a comportamentului plasmidei naturale R 222 în *E. coli* și *Proteus mirabilis* (după Falkow, 1975).

În acest caz, cele două plasmide (de rezistență și de transfer) sînt reunite într-o structură unică *factorul R 222*, sub forma unei *plasmide cointegrate* („cointegrated plasmid”). Asocierea celor două plasmide implică inserția lineară a moleculelor lor circulare, pentru a forma o moleculă circulară mare, printr-o recombinare reciprocă, probabil după modelul lui Campbell (Helinski, 1973). Pătrunse în celulele de *P. mirabilis*, gazdă străină, plasmida R 222 găsește un mediu celular care facilitează disocierea reversibilă a unității compuse, în unitățile mai mici care o formează (Falkow, 1975). După Ptashne și Cohen (1975), proprietatea de asociere și disociere reversibilă este determinată de prezența unor secvențe de inserție (SI) situate în două situsuri, respectiv unde se reunesc regiunile RTF și r.

Plasmidele agregate

Sub această denumire, Clowes (1973) a reunit anumiți factori R, care pot fi alcătuiți din două sau mai multe molecule de plasmide, inițial independente, formînd un agregat plasmidic („plasmide agregate”). Un exemplu tipic este furnizat de plasmida *R delta-SAT* de la *E. coli*, care conferă bacteriei-gazdă funcția de conjugon prin componentul *delta* și rezistența la trei antibiotice, streptomycină (S), ampicilină (A) și tetracilină (T). În urma procesului de conjugare pe care-l inițiază, plasmida ΔSAT poate da naștere la trei tipuri noi de plasmide cu funcții de conjugon *delta* (S), *delta* (A) și *delta* (T) fig. 42).

Cînd celulele donator ce poartă aceste plasmide se conjugă cu alte celule normale, tulpinile care rezultă pot avea fie aceleași caracteristici ca și celulele donator, fie vor conține numai factorul de transfer al rezis-

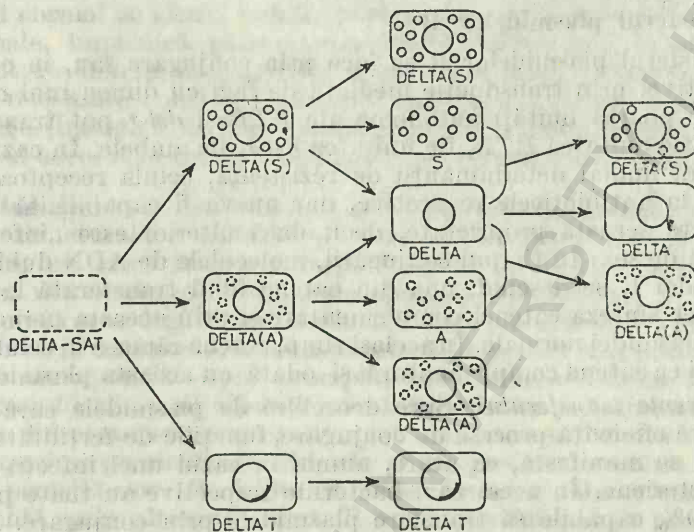


Fig. 42. — Agregatele plasmidiale sînt factori R alcătuiți din mai multe plasmide independente. Bacteria donatoare originală este rezistentă la streptomycină (S), ampicilină (A), tetraciclină (T) și are un factor de transfer (Δ). Prin conjugare se pot forma trei tipuri noi de donatori, fiecare purtînd plasmide de rezistență infecțioasă la un antibiotic (Δ S, Δ A sau Δ T). Cînd aceștia se conjugă rezultă fie celule cu aceeași particularitate ca și donatorul, fie celule cu rezistență neinfecțioasă (S sau A), fie numai factorul de transfer (Δ). Rezistența la tetraciclină este totdeauna infecțioasă (după Clowes, 1973).

tenței (*delta*), fie rezistența neinfecțioasă la streptomycină sau ampicilină. Rezistența la tetraciclina este totdeauna infecțioasă, datorită legării constante a genelor respective de factorul *delta*. Aceste proprietăți au fost explicate prin izolarea a patru plasmide distincte din structura plasmidei originare de rezistență cu o mărime de ~ 80 Mdal: 1) plasmida *delta* avînd ~ 60 Mdal, 2) plasmida S și 3) plasmida A, avînd fiecare cîte ~ 6 Mdal, și 4) plasmide cointegrate *delta T* avînd ~ 67 Mdal. Spre deosebire de plasmidele *delta* și *delta T*, care în mod similar altor plasmide R se găsesc în proporție de 1 : 1 față de cromosomul bacterian, plasmidele S și A se găsesc în proporție de $\sim 10 : 1$ (Preer și Preer, 1977). După Clowes (1973), agregatele plasmidice ar reprezenta o formă de evoluție mult mai primitivă, care a luat naștere probabil prin reunirea unor molecule inițial separate într-o plasmidă integrată de tipul *delta T*.

Clasificarea plasmidelor R

După Watanabe (1971), plasmidele R pot fi clasificate pe baza mai multor criterii diferite sau prin combinarea acestora. Între cele mai importante sînt: 1) natura markerilor de rezistență la antibiotice pe care îi poartă; 2) prezența sau absența proprietății de inhibare a fertilității (fi+

sau fi^-); 3) prezența unor markeri specifici, diferiți de rezistența la antibiotice, ca de exemplu genele lac^+ sau Col^r (rezistență la colicine); 4) particularitățile de incompatibilitate, care au permis caracterizarea a 30 de grupuri diferite la *E. coli*, 8 la *Pseudomonas*, 7 la *Staphylococcus* etc.

Transferul plasmidelor R

Transferul plasmidelor R se face prin conjugare sau, în cazul celor neconjugative, prin transducție mediată de fagi cu dimensiuni mari. Tulpinile care poartă unități autonome ale *FTR* și *det-r* pot transfera prin conjugare fie unitatea *FTR*, fie unitatea *det-r*, fie ambele. În cazul în care se transferă numai determinanții de rezistență, celula receptoare devine rezistentă la antibioticele respective, dar nu va fi capabilă să transmită mai departe această proprietate, decât dacă ulterior este „infectată” cu o plasmidă de sex. În timpul conjugării, moleculele de ADN dublu helicale ale plasmidei R se deschid, una din catene fiind transferată la receptor, unde induce sinteza catenei complementare și prin aceasta permite reconstituirea plasmidei normale. În același timp, catena rămasă în celula donator își reface și ea catena complementară și odată cu aceasta plasmida intactă.

Frecvența transferului. Spre deosebire de plasmidele care induc cu foarte mare eficiență procese de conjugare, funcțiile de fertilitate ale plasmidelor R se manifestă, ca atare, numai în cazul unei infecții recente a celulei bacteriene. În acest caz, bacteriile respective au toate pili de sex și sînt 100% capabile să transfere plasmidele prin conjugare. De aceea, au fost denumite *Hfrt* („High frequency resistance transfer”). Ulterior, frecvența transferului scade foarte mult (10^{-2} per donator și pe oră), paralel cu diminuarea capacității bacteriilor de a forma pili de sex. Această comportare este consecința faptului că plasmidele R codifică sinteza unui represor care inhibă cistronii operonului de transfer (*tra*). Cît timp plasmida este recent stabilită într-o bacterie, represorul este absent sau nefuncțional și ca urmare operonul *tra* se exprimă eficient. În celulele care poartă plasmida R de mai multe generații, cantitatea de represor este mare și eficiența ca transferon a plasmidei respective este doar de $\sim 1\%$ față de cea a plasmidei F.

Mecanismele moleculare ale rezistenței la antibiotice induse de plasmidele R

Rezistența la antibiotice poate fi determinată, într-un număr mic de cazuri, de acțiunea unor *determinanți genetici cromosomal*, reprezentați de segmente de ADN excedentare (transpozoni), integrate prin recombinare genetică sau de modificarea celor existente normal prin mutație. În imensa majoritate a cazurilor însă, fenomenul este condiționat de prezența plasmidelor R, de rezistență multiplă la antibiotice. În unele cazuri, rezistența indusă de plasmide are mecanisme moleculare specifice, deosebite fundamental de cele ale rezistenței indusă de gene cromosomale. Rezistența bacteriilor la acțiunea antibioticelor poate fi indusă prin patru mecanisme biochimice diferite:

1) **Blocarea transportului antibioticului în celulă.** Majoritatea substanțelor terapeutice sînt transportate în celulă, pentru a atinge „ținta” acțiunii lor, fie în sensul unui gradient de concentrație, fie împotriva

acestui prin intermediul așa-numitelor „proteine-purtător” *. Acțiunea proteinelor-transportor ar fi „ajutată” de efectul de „aspirație” exercitat de adevărata „țintă” a medicamentului: ribosomul bacterian sau ARN-polimeraza. Modificările structurale ale acestor proteine (înlocuirea unui aminoacid normal cu altul), induse de plasmide sau de mutații punctiforme cromosomale, împiedică pătrunderea antibioticului în concentrații suficiente pentru a determina o activitate antimicrobiană. În afară de aceasta, bacteriile rezistente conțin proteine suplimentare la nivelul membranei, a căror funcție (ipotetică) ar fi de a respinge anumite antibiotice spre exterior, împiedicând accesul în concentrații active la nivelul ribosomilor.

2) Modificarea structurală a „țintei” pe care acționează antibioticul. Alterarea structurală a „țintei” pe care acționează antibioticul are, pe de o parte, un efect asupra transportului antibioticului în celulă, prin diminuarea sau anularea efectului de „pompă aspiratoare”, și, pe de altă parte, împiedicarea legării antibioticului, care nu mai este „recunoscut” de „ținta” sa de acțiune. Mecanismul este tipic pentru mai multe tipuri de rezistență mutațională. Spre exemplu, mutantele rezistente la streptomycină prezintă ribosomi alterați prin înlocuirea unui aminoacid în structura uneia din proteinele constitutive, iar mutantele rezistente la peniciline și cefalosporine prezintă alterări ale unor proteine speciale (PBP) de legare a penicinelor (Penicillin Binding Proteins). Mecanisme similare de rezistență prin alterarea „țintei” antibioticului pot fi produse și de determinanți genetici ai plasmidelor (ca, de exemplu, rezistența la eritromicină consecutivă modificării ribosomilor de către gene plasmidiale).

3) Rezistența consecutivă utilizării unei căi alternative (paralelă) celei perturbate de antibiotic. Acțiunea terapeutică a sulfamidelor este determinată de blocarea unei enzime care participă la biosinteza acidului folic, absolut necesar pentru viața bacteriilor. Unele microorganisme sintetizează sub acțiunea unor gene plasmidiale enzime specifice, capabile să facă sinteza acidului folic, insensibile la acțiunea substanțelor antimicrobiene. Puterea inhibitorie a sulfamidelor față de enzimele microorganismului rezistent este de o mie de ori mai mică decât față de cele ale microorganismului sensibil. În cazul asociației sulfamidă—trimetoprim (bactrin) trimetoprimul are ca „țintă” o enzimă răspunzătoare de transformarea acidului folic în acid tetrahidrofolie. La microorganismele rezistente s-a putut izola o enzimă controlată de o genă plasmidială care nu este recunoscută de antibiotic și care permite microorganismului rezistent să sintetizeze acidul tetrahidrofolie necesar pentru creștere.

4) Inactivarea antibioticelor prin modificări enzimatice. Plasmidele R induc pe cale enzimatică modificări directe în structura chimică a antibioticului, în urma cărora acesta nu mai poate acționa asupra structurilor sensibile din celula bacteriană. Efectul este tipic asupra antibioticelor de tip aminoglicozidic. Spre exemplu, în cazul streptomicinei, plasmida R induce sinteza unei enzime streptomycin-adeniltransferaza care leagă o

* Proteinele-purtător fac parte din sistemele fiziologice de transport, specifice pentru diferite substanțe utile. Ele sînt „împrumutate” de substanțele toxice, reprezentate de antibiotice, pe bază de asemănare în compoziția chimică cu substratul transportat în mod normal.

moleculă de adenină la streptomycină, cu formare de adenilstreptomycină inactivă, deoarece nu se mai „potrivește” la situsul ribosomal (fig. 43).

Un mecanism similar explică rezistența la cloramfenicol (sub acțiunea cloramfenicol-acetiltransferazei are loc acetilarea produsului activ și transformarea lui în doi produși inactivi (fig. 44), ca și inactivarea kanamicinei sub acțiunea enzimelor km-monofosfotransferaza și km-acetiltransferaza (Watanabe, 1971 Clowes, 1973). Beta-lactaminele formează un grup de antibiotice care include penicilinele și cefalosporinele. Rezistența bacteriană la β -lactamine este determinată de acțiunea unor enzime hidrolitice, din categoria β -lactamazelor (penicilinaza și cefalosporinaza de origine plasmidială), care desfac ciclul β -lactam al antibioticelor respective, convertindu-le la derivați inactivi: acizii penicilinoici, respectiv cefalosporoici (fig. 44).

Mecanismul posibil de formare a plasmidelor R

Formarea plasmidelor R se poate realiza prin integrarea într-un replicon a unor determinanți genetici pătrunși în celulă de la exterior și/sau prin desprinderea unor gene din cromosomul bacterian consecutive unor procese de integrare și excizie eronată. Asemănările plasmidelor R cu plasmida F-prim (capacitate de replicare autonomă, de transfer prin conjugare, de mobilizare a genelor cromosomale și de a conferi un fenotip specific celulei-gazdă) sugerează posibilitatea formării plasmidelor R printr-un mecanism similar celui de formare a factorului F-prim: integrarea repetată a unei plasmide cu funcții episomale în cromosomul unei bacterii, urmată de o excizie eronată, în cursul căreia preia câteva gene cromosomale (Watanabe, 1971).

Procesul de formare a unei plasmide R ar putea începe prin individualizarea în citoplasma bacteriană a unei secvențe de nucleotide având un situs de inițiere pentru replicarea ADN, la care se adaugă ulterior genele ce facilitează transferul prin conjugare (fig. 45). Se formează astfel, o plasmidă nedetectabilă, atât timp cât nu poartă o funcție ușor identificabilă. În cazul în care ea se integrează în cromosomul bacterian aproape de una sau mai multe gene de rezistență la antibiotice, în momentul trecerii în stare autonomă prin excizie eronată poate desprinde și prelua din structura cromosomului determinanții genetici respectivi. Această modificare de structură genetică îi conferă un avantaj biologic incontestabil într-un mediu ostil, cum este cel reprezentat de prezența antibioticelor. Trecerea succesivă a acestei plasmide într-o a doua și respectiv a treia bacterie, rezistente la alte antibiotice, poate duce la legarea mai multor gene de rezistență la antibiotice și la formarea unei plasmide R care conferă rezistență multiplă la antibiotice și chimioterapice. Prezența substanțelor chimioterapice în mediu favorizează răspîndirea lor prin selecția bacteriilor care poartă plasmide R și prin aceasta mărește și posibilitatea dispersării lor infecțioase la alte bacterii în natură. Adăugarea succesivă de gene prin integrare și excizie se poate realiza prin două mecanisme: prin recombinare clasică, condiționată de omologia genetică a ADN plasmidial și cromosomal și de funcția genei *rec A* a cromosomului bacterian, și mai ales

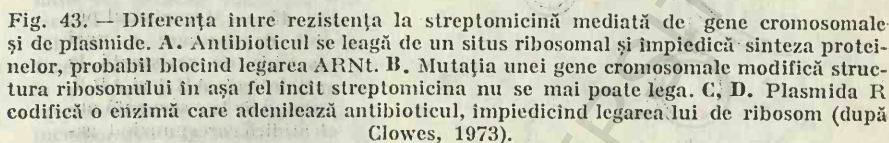


Fig. 44. — Inactivarea enzimatică a antibioticelor de către bacteriile purtătoare de plasmide R (după Watanabe, 1972).

prin intervenția transpozonilor (tabelul nr. 13). Ei înșiși purtători de gene de rezistență la antibiotice și răspunzători de marile rearanjări genetice cromosomale, ca și de posibilitatea de transpoziție de pe un genom celular pe altul, transpozonii pot explica apariția plasmidelor cu rezistență multiplă, ca urmare a modificărilor radicale ale proceselor evolutive determinate de răspîndirea largă a antibioticelor (A. E. Jacob și Hedges, 1974; Novick, 1980).

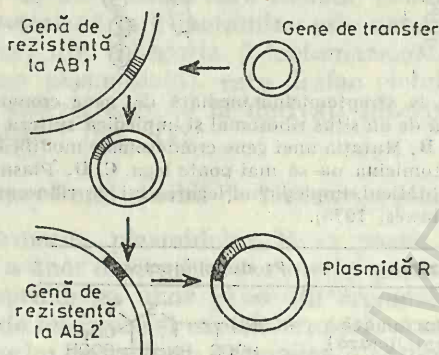


Fig. 45. — Mecanismul posibil de formare a unui plasmide de rezistență la antibioticele AB 1 și AB 2, pornind de la o secvență nucleotidică corespunzând genelor de transfer (după Michel Briand, 1977).

Tabelul nr. 13

Exemple de transpozoni purtători de gene de rezistență
(după Starlinger și Saedler, 1976)

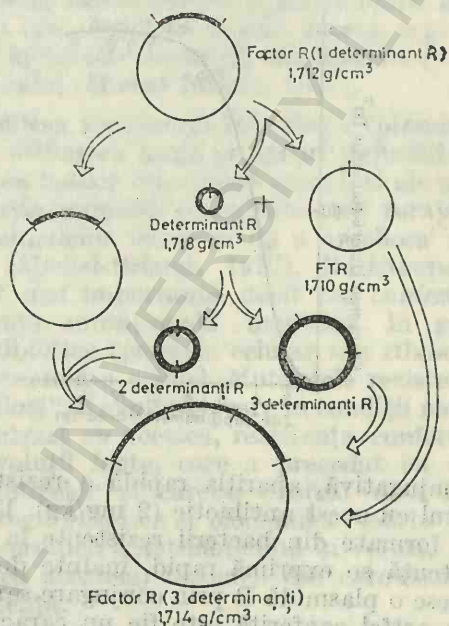
Transpozonul	Lungimea totală în mii de baze (Kb)	Genele de rezistență	Mărimea secvențelor de inserție (Kb)
TnA (Tn1)	4,4	Ampicilină	0,15
TnT (Tn10)	3,8	Tetracilină	[S13] 0,400
TnK1	5,2	Kanamicină	[S12] 1,340 — 1,390
TnC(Tn9)	2,6	Cloramfenicol	[S11] 0,730
TnHg(Tn501)	—	Mercur	—

Legarea „nelegitimă” este favorizată de prezența unei endonucleaze, care secționează catenele ADN, la nivelul la care trebuie să se integreze transpozonul. Ipoteza este foarte plauzibilă în lumina cunoștințelor actuale, dar nu explică situațiile în care mecanismul molecular al rezistenței mutaționale (cromosomale) este fundamental diferit de cel al rezistenței conferite de plasmide. De asemenea, ipoteza nu explică de ce plasmidele R astfel formate nu poartă și alte caractere (markeri genetici cromosomalii), în afară de cei de rezistență.

Fenomenul de tranziție. Studiul ADN plasmidial în gradient de densitate a arătat că în plasmida R 100, funcțiile de transfer și de rezistență la tetracilină sînt asociate cu ADN mai puțin dens, în timp ce ceilalți determinanți ai rezistenței la antibiotice sînt localizați în fracțiun-

nea mai densă a moleculei (fig. 46). Aceste date au confirmat faptul că plasmida *R 100* este alcătuită din doi constituenți (FTR și *det-r*), precum și faptul că rezistența la tetraciclină este legată de FTR. În prezența unui antibiotic în mediu, ca, de exemplu, cloramfenicol, densitatea ADN plasmidial crește semnificativ peste limitele normale, pentru ca după îndepăr-

Fig. 46. — Tranziția unei plasmide *R*. Schema ilustrează disocierea și reasocierea factorului de transfer (FTR) și a determinantilor de rezistență (*r*) la *Proteus mirabilis*, precum și creșterea densității asociată cu incorporarea mai multor copii ale genelor *r* în plasmidele *R* individuale. După incorporarea unui număr mare de copii ale genelor *r*, ADN plasmidial *R* are, în esență, aceeași densitate ca și ADN al determinantilor de rezistență ($1,718 \text{ g/cm}^3$), deoarece cea mai mare parte din masa de ADN este reprezentată de aceștia (după Rownd și colab., 1974).



țarea antibioticului să revină la normal. Pe baza acestor date, Rownd și colab. (1974) au elaborat un model — *tranziția plasmidei R* care încearcă să explice acest fenomen ca un caz particular de amplificare a genelor (cistronilor), pornind de la următoarele premise: 1) FTR, ca și *r-det* sînt repliconi capabili de existență autonomă; 2) replicarea unei plasmide mari este mai dăunătoare celei decît replicarea mai multor plasmide mici; 3) în absența unui proces de selecție (prezența antibioticului), plasmidele mici sînt preferate de celula bacteriană; 4) prezența antibioticului în mediul de cultură implică prezența mai multor molecule de enzime, capabile să-l inactiveze. Acestea pot fi produse prin mărirea numărului de copii plasmidiale, care asigură producerea de mai mult ARNm și de enzime inactivante.

Modelul presupune că ar exista o limită privind numărul de repliconi independenți care pot fi tolerați de o celulă bacteriană. Calea cea mai frecventă folosită pentru a evita depășirea acestei limite este asamblarea unei singure plasmide mari (fig. 46), care poartă în structura sa mai multe copii ale determinantilor de rezistență (*det-r*). Modelul explică tranziția de la ADN cu densitate mică la ADN cu densitate ridicată, deoarece ADN corespunzînd cistronilor *det-r* are o densitate mai mare decît ADN care specifică FTR.

Apariția rezistenței multiple la antibiotice

Datorită particularităților menționate, rezistența la antibiotice se instalează rapid, la un număr mare de membri ai populației bacteriene. Experimental, Mitsuhashi (1971) a demonstrat la animale axenice („germ-free”), infectate cu 7 tulpini de *E. coli*, dintre care una purta o plasmidă

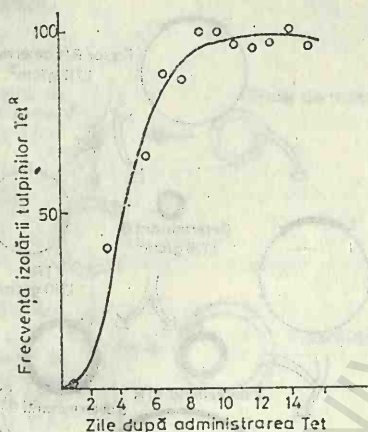


Fig. 47. — Frecvența izolării tulpinilor bacteriene cu rezistență la antibiotice determinată de plasmida R de la animalele gnotobiotice tratate cu tetracilină (după Mitsuhashi, 1971).

R conjugativă, apariția rapidă a rezistenței la tetracilină, după tratamentul cu acest antibiotic (2 mg/kg). Din 2 475 de colonii studiate, 79% erau formate din bacterii rezistente la antibiotic (fig. 47). Fenotipul de rezistență se exprimă rapid, înainte de prima diviziune, la celulele care primesc o plasmidă R prin conjugare sau transducție, evidențiind că rezistența astfel conferită este fie un caracter dominant, fie unul epistatic * față de genele de sensibilitate la antibiotic, cromosomale. Cu excepția unor antibiotice față de care se observă rezistență încrucișată, fiecare tip de rezistență este controlat de un determinant genetic independent, specific.

Semnificația rezistenței multiple la antibiotice. Rolul plasmidelor R în apariția rezistenței la antibiotice este demonstrat, pe de o parte, de corelația strinsă dintre prezența lor în celulele bacteriene și rezistența multiplă la antibiotice și, pe de altă, de paralelismul existent între eliminarea lor și redobândirea sensibilității la aceleași antibiotice.

Prezența plasmidelor R conferă bacteriilor patogene proprietatea de a rezista la concentrații normale letale de antibiotice, creând mari dificultăți în terapia multor infecții. Situația este agravată de posibilitatea transferului plasmidelor R de la bacteriile autohtone purtătoare la bacteriile patogene invadatoare, chiar dacă aparțin altor specii sau genuri taxonomice. Spre exemplu, bacterii ca *E. coli*, *Proteus* sau altele din microbiota intestinală poartă frecvent plasmide R, care le permite să supraviețuiască în prezența unor doze mari de antibiotice și pe care le pot

* Epistazie — formă de interacțiune între două sau mai multe gene care aparțin aceluiași genotip, datorită căreia o genă numită epistatică suprimă manifestarea fenotipică a altei gene, numită hipostatică.

transmite la bacterii din genurile *Salmonella* și *Shigella*, ce devin imediat rezistente la același spectru de antibiotice. Plasmidele R există și în comunități care nu au venit în contact cu substanțele antibiotice. Frecvența rezistenței multiple la antibiotice a crescut de la 0,2% în 1958, la 58% în 1965, ajungând în unele medii spitalicești la 93% pentru *E. coli* și 95% pentru *Proteus*. Cea mai frecventă este rezistența la tetraciclină (95%), urmată de streptomycină, ampicilină, cloramfenicol și kanamicină. Importanța acestui fenomen decurge și din faptul că la om, *E. coli* reprezintă ~ 80% din populația bacteriană facultativ anaerobă din intestin (~ $10 - 10^4$ milioane celule/g materii fecale) (Michel-Briand, 1977).

Un rol important în răspîndirea rezistenței infecțioase (plasmidiale) la antibiotice l-a avut, pe lângă utilizarea largă și uneori nejustificată a acestora în profilaxia și terapia bolilor infecțioase umane și ale animalelor, includerea lor în alimentația animală (ca antibiotice furajere) cu scopul de a stimula creșterea animalelor tinere și de a ameliora starea lor generală și rezistența la boli (Michel-Briand, 1977). Rezistența conferită de plasmidele R este mult mai importantă decît cea conferită de mutațiile cromosomale. Rezistența mutațională modifică, în general „ținta” celulară, sensibilă la antibiotice (peretele celular sau ribosomul), dar reduce eficiența fiziologică generală a celulei. Mutantele rezistente la antibiotice sînt „infirmi” sau „schilози” ai evoluției, care în condiții naturale mor rapid (Novick, 1980). În contrast cu acestea, rezistența conferită de plasmide este rezultatul unei evoluții lente, care a precedat cu multe milioane de ani aplicarea antibioticelor și care a evoluat de-a lungul timpului pentru a ajunge la strategii genetice și biochimice foarte specifice. Acestea protejează „ținta” specifică a antibioticului în celulă, fără a reduce semnificativ adaptabilitatea acesteia, fenomen din care decurge și gravitatea acestei forme de rezistență.

În sfîrșit, mecanismele diferite și relativa ușurință cu care genele de rezistență se pot transmite de la o celulă la alta pot suferi transpoziția de pe o plasmidă pe alta, precum și recombinări genetice, permit ca în anumite cazuri plasmidele R și genele de rezistență pe care le poartă „să supraviețuiască” în populația bacteriană, chiar după moartea gazdei lor originare (Novick, 1980; fig. 48).

Căile de combatere a rezistenței multiple la antibiotice. Conferită de plasmidele R, rezistența multiplă a bacteriilor la antibiotice este una din problemele importante și preocupante ale medicinei contemporane, deoarece creează dificultăți imense în terapia antibacteriană. Observația că unele substanțe chimice, ca acidul nalidixic, determină pierderea a 7 din cele 10 gene de rezistență la antibiotice purtate de plasmide la *Klebsiella pneumoniae*, a dus la ideea găsirii unor substanțe capabile să combată rezistența multiplă la antibiotice și să resensibilizeze bacteriile patogene la agenții chimioterapiei convenționali (Traub și colab., 1973).

Între căile luate în considerație pentru combaterea rezistenței multiple la antibiotice sînt de notat următoarele:

- 1) Utilizarea mai rațională și mai judicioasă a antibioticelor, pornind de la observația dispariției unei plasmide R, în unele cazuri în care antibioticele nu au mai acționat ca un factor de selecție.

2) Obținerea de noi substanțe antibiotice, cu molecule originale, care nu sînt recunoscute de enzimele de inactivare sau față de care plasmidele nu poartă gene de rezistență. Ele pot fi utilizate ca atare sau după modificări chimice care le îmbunătățesc performanțele.

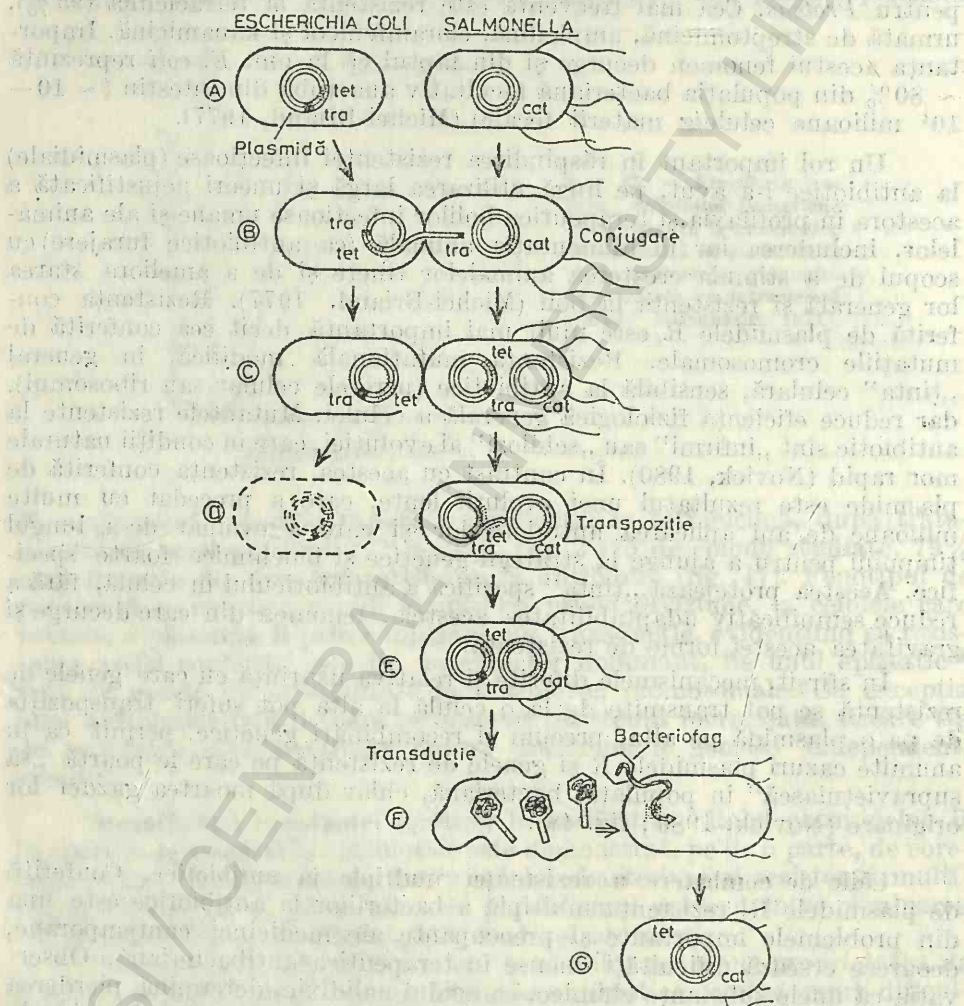


Fig. 48. — Reprezentarea schematică a unor modalități de „supraviețuire” a plasmidelor R, după moartea bacteriei-gazdă naturală. A. *E. coli*, care conține o plasmidă R cu funcție de conjugon (genele *tra*) și gene de rezistență la tetraciclină (*tet*); *Salmonella* sp. conținând gene de rezistență la cloramfenicol (*cat*), B. C. Plasmida R este transmisă prin conjugare și celulele de *Salmonella* devin rezistente la ambele antibiotice. D. Într-un mediu care conține ambele antibiotice *E. coli* moare, dar plasmida R-*tet* „supraviețuiește” în noua gazdă. Gena *tet* localizată într-un Tn suferă un proces de transpoziție pe plasmida R-*cat* rezistentă în *Salmonella*, care astfel poartă o plasmidă R de dublă rezistență (*tet*-*cat*) transmisibilă în continuare prin transducție genetică (E). F. Infecția altor celule de *Salmonella* cu un fag temperat care încapsidează plasmida R-*tet*-*cat* este urmată de replicarea fagului, liza bacteriilor-gazdă și eliberarea de fagi transductori, ce pot transmite plasmida în continuare (G) (după Novick, 1980).

3) Modificarea structurii antibioticelor existente pentru a le face insensibile la enzimele de inactivare, fără ca modificarea să le atenueze sau să le anihileze activitatea antimicrobiană.

4) Descoperirea de substanțe capabile să inhibe specific enzimele de inactivare (de ex., acidul clavulonic, un antibiotic foarte slab, are capacitatea de a bloca specific activitatea β -lactamazelor răspunzătoare de rezistența la peniciline).

5) Eliminarea plasmidelor R cu ajutorul unor substanțe care le inhibă selectiv replicarea.

6) Obținerea de substanțe care interferează selectiv cu exprimarea genelor plasmidiale, fie la nivelul transcrierii, fie la nivelul traducerii informației genetice.

7) Împiedicarea formării de noi plasmide R și/sau inhibarea transferului celor existente (Cohen, 1971; Hahn, 1979).

Plasmidele „Col” și colicinele

(Pl. 12–13)

„Căruțelul principal” care deosebește bacteriocinele de alte antibiotice rămâne faptul că sinteza lor este letală pentru celula în care se realizează și că proprietățile bacteriocinogene nu se pot perpetua într-o cultură decît în stare „potențiată”.

P. FRÉDÉRICQ

Plasmidele „Col” sînt elemente genetice extracromosomale răspunzătoare de producerea unor substanțe antibiotice de tip special, numite *colicine*, de către unele tulpini („Col⁺”) de enterobacteriacee. Fenomenul de colicinogeneză a fost descoperit de Gratia (1925) și studiat de Frédéricq și Gratia (1946), care au dat numele de *colicine* unor substanțe antibiotice produse de *E. coli* tulpina V (virulentă), avînd un spectru de activitate limitat la organisme strîns înrudite cu tulpina producătoare. Ulterior, s-a demonstrat că fenomenul de colicinogeneză este foarte răspîndit (probabil chiar universal) în lumea bacteriilor și, ca urmare, Jacob (1953) a dat denumirile de *bacteriocine*, *bacteriocinogeneză* și *factori bacteriocinogeni*, pentru a desemna substanțele, fenomenul și plasmidele care controlează producerea lor.

Determinanții genetici ai bacteriocinogenezei. Plasmidele sau factorii „Col” sînt molecule de ADN dublu catenare, circulare, închise, superhelicale, cu masa moleculară variînd între $3,1 \times 10^6$ dal și 113×10^6 dal. Nu se știe dacă această structură reprezintă forma în care se găsesc predominant *in vivo*. Au o structură genetică cu complexitate diferită, putînd determina nu numai biosinteza, ci și reglarea sintezei colicinelor, eliberarea acestora din celule, imunitatea celulei-gazdă față de colicinele omologe și unele proprietăți asociate, ca rezistența la UV și sensibilitatea la fagi ϕ

specifici. În cele mai multe condiții de creștere se găsesc în 5—25 copii/bacterie. În celulele în care sinteza proteinelor este stopată cu cloramfenicol, diviziunea este oprită, dar numărul plasmidelor poate să crească pînă la 1.000 (*amplificarea plasmidelor*).

Plasmidele „Col” sînt transferabile de la tulpinile *Col*⁺ la tulpini necolicinogene (*Col*⁻) prin transformare genetică, transducție fagică sau prin contact celular (conjugare). Această ultimă modalitate este posibilă numai în cazul plasmidelor „Col” cu funcție de conjugon (ca, de exemplu, *Col E1*), care poartă în structură lor determinanți genetici de transfer, ce asigură formarea unor pili de sex de tip special (pili I). Plasmidele „Col” incapabile de transfer autonom pot fi transmise prin conjugare, prin intermediul pililor de sex produși de alte plasmide (F sau R), prezente în celula bacteriană.

Plasmidele „Col” sînt de regulă autonome în celula bacteriană. Unele au însă funcții episomale. Prezența factorului *Col* în celulele bacteriene este adesea criptică, datorită represiei producerii de bacteriocine. Represia poate fi suprimată prin iradiere cu UV, care determină exprimarea genei respective și inducția bacteriocinogenezei într-un mod similar fenomenului de lizogenie, în care inducția determină exprimarea funcției vegetative a fagului.

Bacteriocinele

Formează o clasă de substanțe antibiotice cu acțiune bactericidă, sintetizate de anumite tulpini bacteriene, sub influența informației genetice conținută în structura unor plasmide. Încercările de a defini cadrul conceptului de bacteriocine nu au dus la o soluție universal acceptată, ci numai la stabilirea unor criterii, în general aplicabile bacteriocinelor elaborate de bacteriile Gram-negative: 1) bacteriocinele au un spectru de activitate limitat, centrat în jurul speciei omologe; 2) modul lor de acțiune esențial este bactericid; 3) conțin totdeauna o componentă biologic activă de natură proteică; 4) se leagă de celulele sensibile prin intermediul unor receptori celulari specifici; 5) sinteza lor, ca și imunitatea celulei-gazdă este asigurată de gene plasmidiale; 6) biosinteza lor are efect letal pentru celula producătoare.

Bacteriocinele sînt prezente întotdeauna în cantități mici în culturile de bacterii bacteriocinogene. Numărul lor crește în urma proceselor de inducție, care se pot declanșa cu aceleași tratamente care măresc frecvența inducției lizogene. Ca rezultat al inducției, celula producătoare moare ca și în cazul bacteriilor infectate cu fagi virulenți. Ea este sacrificată pentru a omorî ulterior celulele sensibile din mediu.

Nomenclatura. Denumirea bacteriocinelor este formată de la numele de specie sau de gen al bacteriei producătoare, urmat de desinența „cină”, ca de exemplu: *pesticine* (*Pasteurella pestis*), *megacine* (*B. megaterium*), *subtilicine* (*B. subtilis*), *cerecine* (*B. cereus*) și respectiv *vibriocine* (*Vibrio cholerae*), *lactocine* (*Lactobacillus*). În unele cazuri se folosesc chiar două denumiri derivate ca mai sus, nerespectînd denumirea cu prioritate în timp, ca de exemplu: *stafilococine* sau *aureocine* (*Staphylococcus aureus*); *velchicine* sau *perfringocine* (*Welchia perfringens*); *listeriocine* sau *monocine* (*Listeria monocytogenes*), *clostocine* sau *clostridiocine* (*Clostridium*), *coricine* sau *difterocine* (*Corynebacterium diphtheriae*) etc.

Deoarece frecvent bacteriile aparținând unei singure specii pot produce mai multe tipuri de bacteriocine, în mod uzual se adaugă denumirii obișnuite alte detalii convenționale de nomenclatură (litere majuscule, indici etc.). De exemplu: colicina E1—K 30 respectiv colicina tip 1 produsă de *E. coli*, tulpina K 30. Colicinele sînt clasificate în grupuri (A, B, E, I etc.) pe baza acțiunii lor asupra bacteriilor mutante rezistente la un anumit grup.

Structura chimică. Bacteriocinele formează un grup eterogen de substanțe avînd drept proprietăți unificatoare prezența unui component esențial de natură proteică. Cele mai multe sînt proteine pure, altele sînt glucidolipidolipeptide (stafilococine, clostocine etc.) sau complexe lipoproteice asociate cu grupări fosfat (streptocine). Masa lor moleculară variază între 18 000—90 000 dal. Bacteriocinele cu masă moleculară mică sînt dializabile, nu sedimentează prin ultracentrifugare și nu pot fi evidențiate la microscopul electronic. Cele mari sînt sedimentabile și prezintă la microscopul electronic o morfologie similară fagilor defectivi, de care sînt greu de diferențiat. Unele bacteriocine elaborate de bacteriile Gram-pozitive au două sau mai multe forme fizice distincte, putînd apărea ca monomeri sau agregate de monomeri.

Bacteriocinele particulate. Piocinele sînt particule în formă de bastonașe striate asemănătoare cozilor contractile proteice ale fagilor din seria T-par ai *E. coli*. Au fost evidențiate în lizatele culturilor de *Pseudomonas aeruginosa* (bacilul piocianic), după iradiere cu UV (Jacob, 1954).

Dimensiunile lor variază în funcție de tulpina producătoare, avînd lungimi cuprinse între 90 și 125 nm și un \varnothing de 18—20 nm. Cînd apar în stare contractată devine evidentă regiunea centrală („core”) a piocinei, cu un diametru de 5—6 nm. În unele cazuri se pot observa particule (teci) goale ca un tub, lipsite de regiunea centrală (cilindrul axial), în locul căreia pătrunde substanța de contrast. Nu se știe dacă tecile goale apar ca rezultat al purificării sau dacă sînt particule incomplet sintetizate. Unele piocine prezintă structuri terminale de tipul plăcii bazale și al fibrelor cozii, terminate cu un buton cu \varnothing de 1,0 nm.

Aranjarea fibrelor este diferită la piocinele contractate față de cele relaxate. În timp ce la piocinele relaxate cele șase fibre terminale sînt legate de capătul distal al particulei, la cele contractate, două fibre sînt legate de cilindrul axial, iar celelalte de teaca contractilă. Nu se știe dacă aceste structuri sînt părți integrante ale particulei sau resturi din celula-gază, provenite din receptorii celulari. Uneori, ca și unii fagi *E. coli*, bacteriocinele formează rozete, probabil prin interconectarea fibrelor terminale. Preparatele de piocine conțin structuri inelare cu \varnothing de 6 nm și 20 nm, corespunzătoare diametrelor cilindrului axial și respectiv tecii externe, avînd forma de „saibă”. Ele sugerează posibilitatea ca piocinele să fie compuse dintr-o serie de structuri inelare suprapuse, care ar forma final un cilindru gol.

Higerd și colab. (1969) au descris structuri de tipul politeciilor („polysheaths”) și sub forma unor filamente lungi și structuri similare, rezultate din înlanțuirea unui număr variabil de cilindri axiali. Bacteriocinele particulate au fost descrise de către Klerk și colab. (1974) la *Proteus vulgaris*, la care sînt așezate sub forma unor structuri cristaline.

Mecanismul de acțiune al bacteriocinelor

Pentru ca moleculele de bacteriocine sau cel puțin o parte din ele să ajungă și să acționeze asupra „țintelor” sensibile situate în membrana plasmatică sau în citoplasmă, ele trebuie să depășească barierele celulare. Interacțiunea dintre colicine și celulele sensibile evoluează în trei faze succesive (Tagg și colab., 1976):

1) Adsorbția fizică a moleculelor de colicine pe receptorii specifici situați pe suprafața celulelor bacteriene. Procesul este reversibil deoarece nu produce modificări fiziologice, iar îndepărtarea colicinelor în această fază lasă celulele nealterate;

2) Conversia dependentă de energie a colicinelor la o stare nouă, de modificări ireversibile, operațional definite prin incapacitatea de a inactiva colicinele legate de celule cu ajutorul proteazelor și de a proteja celulele sensibile. Această fază corespunde transportului moleculei de colicină sau al unei părți din ea prin membrana externă sau, în unele cazuri, prin membrana citoplasmatică;

3) Interacțiunea biochimică specifică dintre colicine și „ținta” lor, urmată de moartea celulei sensibile.

Rolul receptorilor celulari. Receptorii de bacteriocine sînt proteine multifuncționale, avînd masa moleculară ~ 60 000—80 000 dal, situate la bacteriile Gram-negative în membrana externă. Numărul lor este diferit, variînd între ~ 200 receptori pentru *Col E 2* la *E. coli* și cîteva mii pentru alte colicine. Receptorii ar fi localizați cu predilecție în acele zone ale suprafeței celulare unde au loc joncțiunile dintre peretele celular și membrana plasmatică, ce servesc deopotrivă pentru fixarea unor fagi (T4, Φ X 174), pentru emergența pililor de sex și care ar funcționa drept „canale” pentru transportul moleculelor mari în celulă.

Toți receptorii de colicine izolați pînă în prezent, îndeplinesc în același timp diferite activități fiziologice, funcționînd ca receptori de fagi sau ca părți din sistemele de transport, avînd ca funcție primară, adsorbția și înglobarea dependentă de energie a unor substanțe ca vitamina B₁₂, enterochelina, nucleozidele, fericromul etc. Sinteza receptorilor este controlată genetic. Deși prin capacitatea lor de a lega bacteriocinele receptorii celulari creează un dezavantaj selectiv, deoarece favorizează moartea celulelor respective, ei au fost menținuți în cursul evoluției, datorită funcțiilor lor alternative beneficele pentru celulă, de sisteme de recunoaștere, fixare și înglobare a diferite substanțe utile sau a celor corelate cu potențialul de fertilizare încrucișată a diferitelor tulpini (Reeves, 1975).

Translocația colicinelor prin membranele celulare

Procesul a fost studiat în special la bacteriile Gram-negative la care prezența membranei externe reprezintă un obstacol pentru bacteriocina invadantă. După cum reiese din fig. 49, la *E. coli*, membrana externă conține un număr foarte mare de molecule lipopolizaharidice a căror porțiune lipidică formează regiunea externă a dublului strat membranar. Acest strat este relativ rigid și impermeabil la molecule hidrofobe cu masă moleculară mare, datorită, pe de o parte, faptului că moleculele lipopolizaharidice prezintă (sub acțiunea atomilor de Mg) numeroase legături transversale și, pe de alta, datorită prezenței citorva sute de mii de molecule

de proteine transmembranare numite porine*. Acest strat conține însă o serie de receptori specifici. Sub membrana externă și legat de ea printr-o lipoproteină se găsește stratul peptidoglicanic — cu structura unei rețele, ale cărei ochiuri nu reprezintă o barieră pentru colicine. Cel de-al treilea strat, membrana plasmatică (sau internă), constituie „ținta” colicinelor

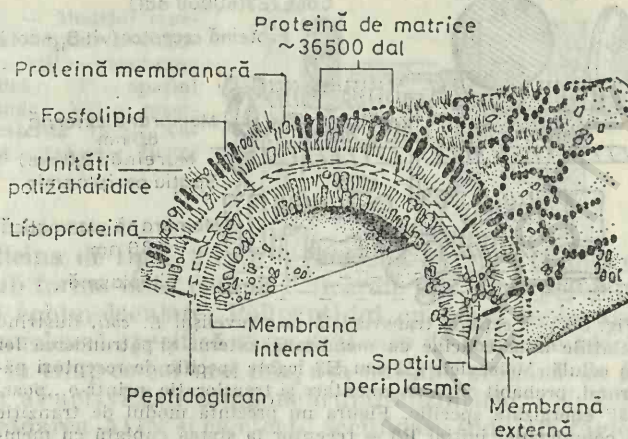


Fig. 49. — Reprezentarea schematică a învelișurilor *E. coli*, prezentind un punct de adeziune între membrana plasmatică (internă) și membrana externă, care ar putea reprezenta un canal de comunicare între ele. Receptorii de colicine sînt localizați în membrana externă. Membrana externă este dominată de unul sau două tipuri de proteine — porinele — care formează pori hidrofilici transmembranari (după Holland, 1979).

din grupurile E1 și I, în timp ce colicinele E3 trebuie să o străbată pentru a ajunge la „ținte” intracelulare. Există numeroase puncte de adeziune între membranele internă și externă, la nivelul cărora, probabil, în mod normal, s-ar elibera constituenții nou sintetizați ai membranei externe, ar fi injectat ADN fagic și probabil ar pătrunde cel puțin unele colicine.

Trecerea colicinelor prin membranele de înveliș bacteriene este facilitată de forma alungită a moleculei lor. Legarea de receptori specifici este urmată de translocția dependentă de energie, în urma căreia cîteva din moleculele legate ajung în contact cu o regiune — probabil specifică a membranei plasmactice. După Holland (1979), această etapă este suficientă pentru colicinele I și E1, care acționează direct pe membrană, în timp ce colicinele E2 și E3 ar pătrunde în interiorul celulei pe calea unei porți specifice „energizate” pentru a acționa final pe ADN „țintă” (fig. 50).

Interacțiunea dintre colicine și substratele „țintă”

Mecanismele prin care colicineleucid celulele sensibile, elucidate în cîteva cazuri, sînt neobișnuite și neașteptate. În funcție de natura ațintei” asupra căreia acționează și prin intermediul căreia blochează o „numită funcție esențială pot fi clasate în trei categorii (Luria, 1975):

* Porinele — cea mai importantă fiind proteina 1 — lasă să treacă liber moleculele hidrofule cu $M \sim 700$ dal (ca oligozaharidele și oligopeptidele), în timp ce sistemele specifice de transport ale membranei externe permit trecerea moleculelor mult mai mari de 700 dal.

1) Colicinele tip Ia, E 1 și K afectează metabolismul energetic prin interacțiune directă cu membrana plasmatică. Fixarea moleculei de colicină pe receptorul celular din membrana externă bacteriană este urmată

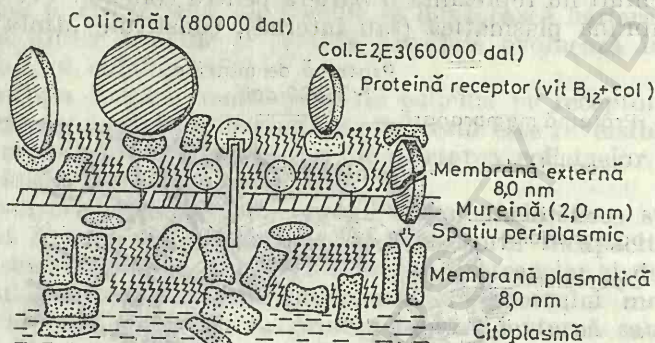


Fig. 50. — Secțiune transversală prin învelișul *E. coli*, ilustrând relațiile unor colicine cu membrana externă și pătrunderea lor în celulă. Moleculele E2 sau E3 legate specific de receptori pătrund, probabil după fragmentare și translocație, printr-o „poartă” energizată specific. Figura nu prezintă modul de tranziție a complexului inițial E3 — receptor la starea cuplată cu membrana internă. Tranziția ar putea implica difuzia colicinei în membrană și/sau formarea unui complex intermediar cu proteinele adiționale ale membranei externe, înainte de cuplarea lor finală cu membrana internă (după Holland, 1979).

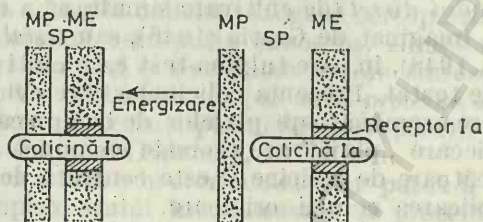
de interacțiunea dependentă de energie dintre colicină și membrana plasmatică, urmată de o serie de efecte negative ca : alterarea permeabilității membranei plasmatică indusă de colicină, inhibarea fosforilării oxidative, stoparea sintezelor macromoleculare (ADN, ARN, glicogen), precum și blocarea transportului activ al aminoacizilor, lactozei, K⁺ și altor compuși, din mediu (Konisky, 1977).

Mecanismul acțiunii colicinei Ia. Konisky și Tokuda (1979) au arătat că Col Ia, E1 și K ale *E. coli* afectează metabolismul energetic, interacționând direct cu membrana plasmatică. Ele duc la o translocație intermembranară de ioni, la depolarizarea membranei și final la perturbarea transportului activ și inhibarea sintezelor macromoleculare. Procesul ar evolua în trei etape : 1) adsorbția Col Ia pe receptorul din membrana externă, ce asigură accesul colicinei la membrana plasmatică ; 2) interacțiunea dependentă de energie a Col cu aceasta ; 3) alterarea permeabilității membranei plasmatică indusă de colicină. După modelul lui Konisky și Tokuda (fig. 51), distanța dintre cele două membrane nu este constantă, ci variază în funcție de starea energetică a celulei.

Nieva-Gomez (1977) a arătat, de altfel, că volumul spațiului periplasmic este de ~ 20—40% din volumul total al celulei în cazul celulelor deenergizate și de numai 1% la cele energizate. Adăugate unor celule deenergizate, Col Ia se adsorb pe proteinele receptor specific ale membranei externe. Energizarea ulterioară adsorbției duce la o scădere a distanței intermembranare, care determină contactul și interacțiunea Col Ia cu membrana plasmatică. Nu se cunoaște modul în care Col Ia, E 1 și K

alterează permeabilitatea membranei plasmatice. Ele ar putea traversa membrana, formind numai „canale”, sau ar afecta permeabilitatea membranei indirect prin alterarea stării lipidelor și/sau proteinelor membranare.

Fig. 51. — Modelul schematic de acțiune a colicinei Ia: MP — membrana plasmatică; SP — spațiul periplasmic; ME — membrana externă (după Konisky și Tokuda, 1979).



2) Colicina de tip E 2 este o proteină cu $M \sim 60\,000$ dal, secretată de celule sub forma unui complex alcătuit din două polipeptide prezente în cantități echimoleculare. Polipeptidul cu masă moleculară mai mare este o endonuclează specifică răspunzătoare de leziunile biochimice induse de *Col E2*, în timp ce cel mai mic, așa-numita *proteină de imunitate*, este un inhibitor al activității componentului enzimatic. *Col E2* are ca efect primar degradarea ADN și ca efecte secundare inducția fagică, degradarea ribosomilor și a ARNr, modificări structurale ale membranei plasmatice, efecte inhibatorii asupra sistemelor de transport și asupra diviziunii celulare (de Graaf, 1979).

Interacțiunea letală cu celula implică inițial legarea de membrana externă, crearea unei incizii monocatenare în ADN, urmată de degradarea exonucleolitică a fragmentelor de ADN de către nucleaze. Proteina de imunitate legată de complexul E2 are probabil rolul de a stabiliza *Col E2*, de a o menține într-o configurație corectă pentru a se lega de receptorii membranei și pentru a pătrunde prin învelișurile celulare. Îndepărtarea ei scade activitatea letală a *Col E2*, iar reconstituirea complexului o readuce la normal.

Rolul ei în determinarea efectului letal nu este clar. S-ar putea ca în celulă să se desprindă din complex, pentru a permite componentului enzimatic să-și exercite acțiunea.

3) Colicinele de tip E 3. După recunoașterea și legarea reversibilă de receptorii celulari, *Col E3* suferă, de asemenea, translocția dependentă de energie prin învelișul celular și determină inactivarea ribosomilor 30 S prin clivarea endoribonucleolitică a ARNr 16 S (de Graaf, 1979). În sfârșit, megacina, streptocina și butiricina au efect litic asupra membranei celulare, piocina S2 perturbă metabolismul lipidelor, iar freundicina pe cel al proteinelor și al ARN (Reeves, 1979). Bacteriocinele sintetizate de bacteriile Gram-pozitive au efecte variate, afectând producerea de energie, sinteza macromoleculilor, transportul prin membrane și permeabilitatea, care pot antrena modificări structurale (condensarea materialului nuclear, pierderea parțială a ribosomilor, modificarea mezosomilor, dizolvarea conținutului celular) sau tulburări metabolice secundare, care pot duce la efecte sporostatice, bacteriostatice, formare de protoplaști sau bacterioliză.

Detectarea antagonismului bacteriocinic

Se face prin cercetarea efectului de inhibare a creșterii unei tulpini bacteriene sensibile, ca indicator (cu comportare pasivă în reacție), sub acțiunea tulpinii de testat (activă). În practică se folosesc diferite variante ale *testului direct* (de cultivare simultană a celor două tulpini, test și indicator), imaginat de Gratia (1946), sau *testul antagonismului întârziat* (Frédéricq, 1948), în care tulpina-test este cultivată înainte de adăugarea tulpinii de testat. Prezența colicinelor este evidențiată de apariția unor zone lacunare asemănătoare plajelor de liză, în care cultura „în pinză” a dispărut. Fiecare „plajă” are teoretic ca punct de plecare o singură bacterie producătoare de colicine și este centrată de o colonie mică, rezultată din multiplicarea celulei originare.

Spectrul de activitate a colicinelor. Spre deosebire de antibioticele clasice, cu g.m. mică, bacteriocinele elaborate de bacteriile Gram-negative au un spectru de activitate restrins, care se limitează la tulpini aparținând speciei producătoare sau unor specii foarte strins înrudite. Această particularitate este consecința interacțiunii lor specifice cu receptorii din membrana externă (Reeves, 1979). Dovada o constituie faptul că atunci când sînt puse în contact direct cu „ținta” lor biochimică *Col. E3* inactivează ribosomii unor bacterii normal rezistente (Sidikaro și Nomura, 1973), iar *Col. E2* acționează chiar asupra ADN viral SV40 (Schaller și Nomura, 1976).

Bacteriocinele bacteriilor Gram-pozitive sînt lipsite de specificitate și, ca urmare, au un spectru de activitate larg, fiind active asupra bacteriilor Gram-pozitive foarte îndepărtate sistematic de specia producătoare și chiar față de unele bacterii Gram-negative. Datele referitoare la cinetica acțiunii colicinelor arată că acestea se comportă ca agenți letali particulați, care omoară dintr-odată bacteriile sensibile printr-un proces de tipul „o singură lovitură” („one single hit process”), indicînd faptul că o singură particulă poate omori o celulă sensibilă. Colicinele adiționale nu au efect (omorire „cuantală” spre deosebire de omorîrea „molară” sau „cooperantă” a antibioticelor uzuale, Luria, 1970).

Prezența unui număr mare de colicine în mediu mărește posibilitatea șanselor de omorire pe unitate de timp. Sub acțiunea colicinelor și a altor bacteriocine elaborate de bacteriile Gram-negative, se observă o mărire lentă, progresivă a volumului celulei, ceea ce, la un moment dat, provoacă ruperea peretelui celular, astfel că în cîteva ore sau zile survine bacterioliza. Bacteriocinele bacteriilor Gram-pozitive au, dimpotrivă, o acțiune mai rapidă și mai brutală.

Imunitatea față de bacteriocine

Caracteristica principală a colicinelor, care le deosebește fundamental de alte antibiotice, constă în aceea că sinteza lor este letală pentru celulele în care s-a efectuat și că proprietatea de colicinogeneză nu se poate perpetua într-o cultură bacteriană, decît în starea ei potențială. Periodic, acest caracter letal potențial devine actual și se manifestă prin formarea de particule antibiotice, care produc moartea și liza propriei lor celule de origine, eliberîndu-se astfel în mediu. Odată eliberată în mediu, o anumită colicină are efect antibiotic numai asupra celulelor de aceeași specie, care

nu o pot, la rindul lor, elabora, fiind lipsite de factorul Col respectiv. Celulele colicinogene care posedă factorul genetic Col nu sînt însă sensibile la acțiunea antibiotică a colicinei omologe elaborată de alte celule purtătoare ale aceluiași factor, ca și cum prezența acestui caracter letal potențial le-ar fi făcut imune la acțiunea colicinei exogene corespunzătoare.

Mecanismul imunității celulare este puțin cunoscut. Imunitatea se manifestă după adsorbția bacteriocinei și s-ar putea datora sintezei unei substanțe specifice imunitare. Un rol important l-ar avea *proteina de imunitate*, codificată de gene situate pe aceeași plasmidă, care poartă genele structurale pentru biosinteza colicinei (Konisky, 1977).

Protecția față de acțiunea letală a bacteriocinelor ar putea fi determinată de formarea unui complex stabil între acestea și proteinele de imunitate (Reeves, 1979). Proteinele de imunitate identificate la mai multe bacteriocine (ColE2, E3 cloacina DF13 etc.) ar permite bacteriilor respective să supraviețuiască în timp ce produc o bacteriocină activă pe alte tulpini ale aceleiași specii. Imunitatea este deosebită de rezistența la bacteriocine, care corespunde pierderii sau modificării receptorului specific prin mutație, ceea ce duce la incapacitatea de a adsorbi bacteriocină din soluție. Prezența imunității specifice la bacteriocina omologă este o proprietate absolut necesară pentru supraviețuirea organismelor bacteriocinogene în natură.

Originea colicinelor. Colicinele ar putea proveni din anumiți bacteriofagi, printr-un proces de evoluție regresivă și în primul rînd printr-o eliminare treptată a genelor fagice, pînă la dispariția lor completă. Asemănarea unor bacteriocine (piocinele) cu cozile unor fagi contractili, precum și proprietatea unor colicine de a avea receptori de fixare comuni cu cei ai unor bacteriofagi, pledează în favoarea acestei ipoteze sau a unei eventuale origini comune.

Semnificația biologică. Prezența universală a fenomenului de bacteriocinogeneză în lumea bacteriilor și persistența lui de-a lungul evoluției reprezintă, probabil, expresia unei semnificații biologice deosebite și, în primul rînd, a unui rol de reglare a dinamicii populațiilor bacteriene în diferite ecosisteme. Capacitatea de a produce bacteriocine ar mări șansele de supraviețuire ale celulelor purtătoare de plasmide Col, împiedicînd colonizarea nișei lor ecologice de către alte microorganisme sensibile, provenite din afară.

Bacteriocinele au aplicații în studiile epidemiologice putînd fi folosite ca un marker specific între proprietățile bacteriilor patogene. Au fost elaborate mai multe scheme de tipizare, bazate fie pe producerea, fie pe sensibilitatea la o gamă de bacteriocine diferite. Corelate cu alte metode (tipizarea prin fagi, serologie etc.) aceste date pot da informații pretioase privind circulația tulpinilor la bolnavi și purtători, facilitînd organizarea măsurilor de luptă anti-epidemică.

Elementele genetice transpozabile ale bacteriilor

(Pl. 16)

„Geneticienii au crezut mult timp că genele nu pot să se deplaseze...”

J. A. SHAPIRO

Elementele genetice transpozabile (EGT) sînt entități genetice discrete *, cu limite structurale bine precizate, sub forma unor segmente specifice de ADN, care se pot integra repetat în mai multe situsuri într-un genom; ca urmare, se pot deplasa de la o anumită poziție într-o altă poziție, în același genom sau în genomuri diferite. În sens larg, definiția este aplicabilă elementelor genetice cunoscute sub denumirea de secvențe de inserție, transpozoniilor, unor entități cu faze libere de evoluție de tipul fagilor λ și Mu, precum și unor plasmide cu funcții episomale (Cohen, 1976). Sînt cunoscute și sub denumirea de *secvențe de translocare* (Novick, 1976), *elemente translocabile* („Translocatable elements”, Kleckner, 1977) sau *elemente de inserție* („Inserting elements”, Campbell, 1979).

Caracterul cu totul surprinzător al acestor structuri este reflectat și în numărul mare și caracterul insolit al denumirilor propuse; *elemente mobile*, *gene călătoare* („Wandering Gene”), *gene care sar* („Jumping genes”; „gènes sauteurs”), *gene hoinare* („Hitchiking genes”), *vagabonzi genetici* (Novick, 1980), *gene plimbătoare* („gènes flanneurs” sau „baladeurs”; Rives, 1984), *vehicule genetice autopropulsate* (Drake, 1984), *specii nomade* (Glicksman și Ripley, 1983), *ciudățeniile (fantezii) genetice* („Genetic freaks”, Rhaeus, 1979).

Elementele genetice transpozabile au fost descrise inițial la porumb (Mc Clintock, 1952, 1956), sub denumirea de *elemente de control* („Controlling elements”). La această plantă ele induc modificări importante în structura cromosomilor, transmisibile ereditar, care controlează pigmentarea boabelor și apariția aspectului variegat sau marmorat, datorită diferențelor de culoare. Mc Clintock a mai demonstrat că elementele de control nu rămîn fixate la un anumit situs pe cromosom, ci par să fie capabile să se deplaseze de la un situs la altul, producînd instabilitatea expresiei genelor și modificări structurale în fiecare locus cromosomal. Ulterior, Malamy (1967) a descris o clasă neobișnuită de mutații la *E. coli* al cărui efect era decelabil dincolo de limitele genelor mutante (mutațiile polare), iar Saedler și Starlinger (1972) au arătat că acest tip de mutații apărea ca urmare a inserției unui segment mare de ADN (~ 2 000 pb lungime).

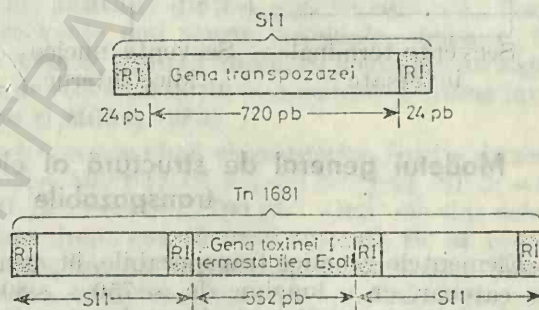
Au fost descrise pînă în prezent la unele virusuri, bacterii, levuri, porumb și *Drosophila*. Prezența lor la virusuri este corelată, în mod ne-

* Discret — cu sensul atribuit în fizică și în matematică, respectiv cu limite distincte, individualizate, alcătuit din părți separate, discontinuu (antonim față de continuu).

îndoielnic, cu existența obligatorie intracelulară a acestora, cel puțin într-o anumită fază a ciclului lor de dezvoltare. Prezența la organisme atât de îndepărtate din punct de vedere al organizării lumii vii (bacterii, *Drosophila*) a dus la concluzia că EGT sînt fie larg, fie universal răspîndite în lumea vie (Callos și Miller, 1980). Au fost descrise și la o serie de bacterii ca : *E. coli*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Bacillus* etc. Probabil că au o răspîndire universală la procariote, la care pot fi considerate constituenți normali ai cromosomului, plasmidelor și bacteriofagilor.

Clasificare și terminologie. O anumită secvență de ADN constituie un element genetic transpozabil dacă își menține atât integritatea fizică, structurală, cît și pe cea genetică, funcțională, în cursul translocației, independentă de sistemul *rec A*, de la o poziție la alta pe același genom sau pe alte genomuri (Kleckner, 1977). Pe baza complexității lor genetice, elementele care îndeplinesc această condiție pot fi grupate în trei categorii : 1) *secvențele de inserție* (SI) cu dimensiuni mici, în medie $\sim 1\,000$ pb; 2) *transpozonii* (Tn), EGT purtătoare de gene cu expresie fenotipică (fig. 52) și 3) *bacteriofagii*. Unele elemente transpozabile (fagul λ) au faze libere identificate cu certitudine, în timp ce altele (SI și Tn) sînt în prezent cunoscute numai în stare inserată. După grupul de experți în nomenclatură condus de Campbell (1979), un termen generic recomandabil pentru a desemna EGT ale procariotelor este cel de *secvențe de translocație* propus de Novick și colab. (1976).

Fig. 52. — Reprezentarea schematică a secvenței de inserție SI 1 care conține gena enzimei transpozaza, răspunzătoare de „mobilitatea” ei (sus); jos = schema transpozonului Tn 1681, alcătuit din două SI 1, și gena care codifică toxina termostabilă I la *E. coli*, delimitată de două secvențe repetate invers (RI) (după Watson și colab., 1983).



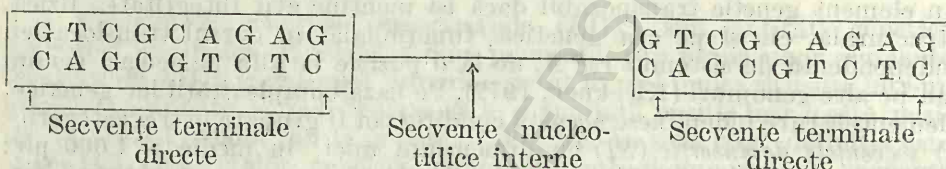
Pe baza datelor din literatura de specialitate, recomandăm folosirea terminologiei referitoare la EGT, în următoarele accepțiuni : *transpoziție* sau *translocație*, schimbul unui segment de ADN între genomuri neomologe sau în regiuni neomologe ale aceleiași molecule de ADN (Kopecko, 1980). După Callos și Miller (1980), transpoziția reprezintă apariția unui segment de ADN cu lungime definită (elementul transpozabil), în mijlocul unor secvențe în care anterior nu a fost detectat. Deși termenii de transpoziție și translocație sînt foarte apropiați, primul este preferabil pentru a descrie schimbul de ADN între segmente neomologe. Termenul de translocație este frecvent folosit în biochimie pentru a descrie transportul moleculelor prin membrane, deplasarea peptidil-ARN de la situsul A la situsul P ribosomal, în cursul traducerii genetice etc.

Transpoziție genetică, termen general pentru a descrie deplasarea *in vivo* a unui segment de ADN, de la un situs la altul, indiferent de tipul de sistem de recombinare de care este dependent.

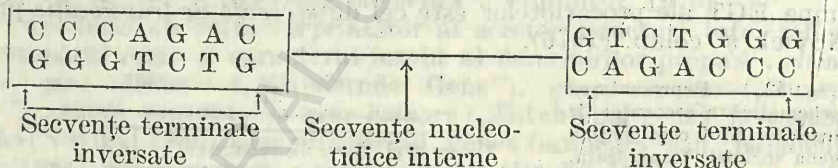
Transpoziție specializată, deplasarea *in vivo* a unui segment de ADN, de la un situs la altul, mediată de sistemele de recombinare specializată.

Elemente transpozabile, termen folosit de Mc Clintock (1952) pentru a descrie *elementele mobile* de la porumb. Este folosit colocvial pentru a descrie elementele genetice transpozabile la procariote și la eucariote.

Secvențe repetitive directe („Directed repeats”): situație în care secvențele nucleotidice repetate la extremitățile unui segment de ADN au aceeași ordine de succesiune pe aceeași catenă:



Secvențe repetitive inverse („Inverted repeats”): în care secvența nucleotidelor de la una din extremitățile moleculei de ADN transpozabil este complementară în ordine inversă față de o secvență situată pe aceeași catenă, la celălalt capăt al moleculei:



Modelul general de structură al elementelor genetice transpozabile

Elementele genetice transpozabile, în general, sînt molecule de ADN dublu catenar, cu o lungime de $\sim 750 - \sim 80\,000$ pb. Ele sînt formate dintr-o regiune de ADN centrală, cu lungime variabilă după natura EGT, flancată, de ambele părți, de secvențe terminale repetate, fie în ordine directă (normală), fie în ordine inversă (fig. 53). Ca o consecință a existenței secvențelor terminale repetate, EGT se pot insera în diferite genomuri, în fiecare din cele două orientări fizice posibile (Kopecko, 1980).

Secvențele de inserție

Secvențele de inserție (SI) sînt primele EGT descrise la bacterii. Existența lor a fost demonstrată de Saedler și Starlinger (1967, 1972) în urma studierii mutațiilor polare în operonii *lac* și *gal* la *E. coli*. Inserția unei SI într-o genă suprimă funcția genei respective și produce astfel o mutație. Dacă gena

face parte dintr-un operon, inserția SI produce efecte severe polare, reducând foarte mult exprimarea genelor localizate distal față de mutație, în raport cu regiunea P—O (promotor—operator). Sint cele mai simple elemente de inserție cunoscute, avind o lungime de ~ 800 — $\sim 1\,400$ pb (corespunzătoare la 1—2 gene). Callos și Miller (1980), precum și Cornelis (1982) consideră că pot ajunge la 5 000—5 700 pb.

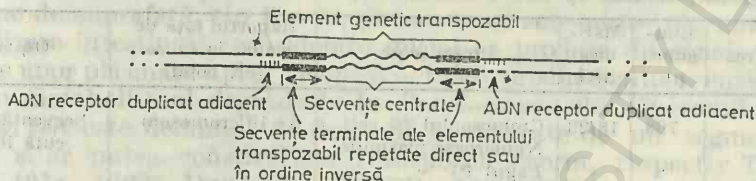


Fig. 53. — Modelul general de structură a elementelor genetice transpozabile. Atit SI, cit și Tn au o regiune centrală (linia ondulată), flancată de secvențe terminale (dreptunghiuri negre), repetate în ordine directă sau în ordine inversă. În cursul inserției se produc breșe monocatenare decalate în zonele marcate cu asterise și reunirea lor cu extremitățile monocatenare ale moleculei de ADN receptor. Ulterior, are loc sinteza de ADN care „umple” golurile în molecula de ADN (.....). Se creează astfel secvențe duplicate ale moleculei receptoare la cele două extremități ale SI sau ale Tn inserat (după Kopecko, 1980).

SI nu conțin nici o genă cunoscută și nu au nici o altă funcție în afară de cea de inserție. De aceea, prezența lor nu conferă celulelor nici un caracter nou evident. Singurele consecințe observate după inserția lor sint modificările în expresia unor gene sau modificările în rata incidenței delețiilor, în regiunile adiacente situsului lor de inserție. Toate SI analizate pînă în prezent sint alcătuite dintr-o regiune centrală, flancată la ambele extremități de secvențe mai scurte terminale, repetate fie în ordine directă, fie în ordine inversă. Spre exemplu, SI 2 conține un segment central de 1/250 pb, flancat de secvențe de 40 pb repetate în ordine inversă, la fiecare extremitate (Callos și Miller, 1980).

Pînă în prezent au fost descrise cinci clase diferite, lipsite de omologie între ele la *E. coli*: SI 1 (~ 800 pb), SI 2 ($\sim 1\,350$ pb), SI 3 ($\sim 1\,400$ pb), SI 4 ($\sim 1\,400$ pb) și SI gama-delta (5 700 pb). Deși ele sint cele mai active la *E. coli*, la care apar drept constituenți normali, fie ai cromosomului, fie ai plasmidelor sau fagilor, nu se poate spune încă dacă sint singurele SI prezente la această bacterie (Beserner și Starlinger, 1977). Saedler și Heiss (1973) au descris în cromosomul *E. coli* K12 opt copii de SI 1, 5 SI 2 și 3 SI 3, situate într-o regiune de 290 kb. Utilizind metoda mai sensibilă de analiză a ADN a lui Southern (1975), Nyman și colab. (1981) au confirmat numai parțial aceste date, arătind prezența a 6—10 SI 1, 5 SI 3, precum și a unei SI 4 în cromosomul de *E. coli* și a 40 SI 1 în cromosomul de *Shigella*. Ptashne și Cohen (1975), precum și Chow și Bakhari (1976) au descris prezența SI la fagul P1 și în plasmidele F și R ale *E. coli* (tabelul nr. 14).

Funcțiile secvențelor de inserție. Secvențele de inserție nu se replică autonom. Ele sint capabile de transpoziție în fiecare din cele două orientări fizice posibile, ca o unitate lineară nepermutată, de la un situs receptor la altul, pe același genom sau un genom diferit (Kopecko, 1980). Sint detectate pe baza efectelor caracteristice pe care le produc la nivelul noilor

situsuri și în special pe baza mutațiilor puternic polare, respectiv prin reducerea expresiei genelor localizate distal de inserție, în raport cu regiunea P—O dintr-un operon.

Tabelul nr. 14

Caracteristicile principale ale secvențelor de inserție descrise la *E. coli* (după date din literatură)

Denumirea	Lungimea pb.	Mărimea SRI	Prezente pe	Raportul față de genom la <i>E. coli</i> (nr. copii)	Observații
SI 1	768	18/23	Cromosomul <i>E. coli</i> Numeroase plasmide Fagul P1 Tn 951	6—10/cromosom 5 /cromosom 1/plasmida F	Secvență cunoscută integral
SI 2	1 237	30/42	Cromosomul <i>E. coli</i> Numeroase plasmide Plasmida F	5/ cromosom 2 /F	Rol în integrarea plasmidei F Secvență integral cunoscută
SI 3	1 300	30/39	Cromosomul <i>E. coli</i> Numeroase plasmide Plasmida F	1 sau 2/cromosom	Secvență integral cunoscută
SI 4	1 426	16/18	Cromosomul <i>E. coli</i>	1 sau mai multe/ cromosom	Secvență integral cunoscută
Gama-delta	5 700	35/35	Cromosomul <i>E. coli</i>	1 /F	—

Polaritatea este probabil consecința unei blocări a sintezei ARNm, datorită căreia genele distale ale operonului nu mai pot fi transcrise *in vivo*. Secvența de recunoaștere a ADN receptor pare să fie foarte scurtă. Pe baza studiilor lui Bukhari și Zipser (1972) asupra integrării SI în operonul *gal* *E. coli* se poate conchide că acest proces nu are nici gradul de specificitate al fagului λ , față de situsul de legare *att* B (bacterian), dar nici absența practică a specificității de integrare a fagului Mu. Deși teoretic la fiecare 1 000 de baze în molecula de ADN o anumită secvență specifică de cinci nucleotide revine în mod cu totul întâmplător, unele regiuni par să fie preferate pentru inserție. Integrarea SI ar avea o specificitate „regională”, respectiv capacitatea de a se integra ca o unitate bine delimitată în mai multe situsuri, situate într-un segment scurt, preferat, al ADN receptor (Kopecko, 1980). Unele SI prezente pe plasmidele R fac legătura între determinanții de rezistență (det-r) și factorul de transfer al rezistenței, furnizând astfel mecanismul molecular care asigură fenomenul de disociere al celor două unități genetice la *Proteus mirabilis* (vezi capitolul „Plasmidele R”).

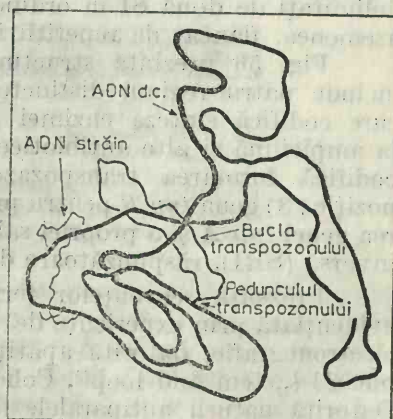
Transpozonii

Hedges și A. E. Jacob (1974) au propus denumirea de transpozon pentru a defini o secvență specifică de ADN, cu potențial de transpoziție specializată (*rec* A independentă), care poate exprima trăsături fenotipice

noi, fără legătură cu funcția de inserție (transpoziție). Între proprietățile fenotipice noi care pot fi conferite de transpozoni au fost evidențiate: rezistența la unul sau mai multe grupuri de antibiotice (ampicilină, streptomycină, cloromicetina, tetraciclina, kanamicina, sulfamide, trimetoprim etc.), rezistența la metale grele (Hg^{2+}), capacitatea de a face sinteza enzimelor implicate în metabolismul lactozei, rafinozei, toluenului, xilenului, salicilatului etc. producerea de enterotoxine și sinteza antigenelor bacteriene de suprafață, tip K-88, sinteza unor substanțe răspunzătoare de colonizare intestinală (considerate inițial ca produse de genele structurale ale unor plasmide tipice (Kopecko, 1980), producerea unor enzime implicate în metabolismul degradativ la *Pseudomonas* etc. Operonul *lac* însuși al *E. coli* este delimitat de două SI 3, separate de un segment de ~75 kb și ar putea constitui un transpozon enorm, respectiv Tn 951 (Cornelis, 1978, 1982). După Chow (1977), 14% din cromosomul *E. coli* are o configurație topologic echivalentă cu a Tn, fiind formată din secvențe de ADN cuprinse între două SI.

Structura fizică și genetică. Transpozonii sau transloconii (notați cu simbol *Tn*, urmat de un număr diferit pentru fiecare izolat independent din natură) sînt elemente genetice transpozabile mai complexe, a căror mărime variază între 4 500 și 80 000 pb. Ei sînt formal similari secvențelor de inserție, de care se deosebesc însă prin complexitate și prin faptul că poartă gene care conferă bacteriilor funcții noi, detectabile. Evidențierea transpozonilor a fost făcută de Schwesinger și Novick (1980) cu ajutorul plasmidelor *pI* 258, care poartă un transpozon de rezistență la eritromicină și al plasmidei *pI* 6187. După denaturarea moleculelor respective, catenele separate sînt puse în condiții favorabile pentru renaturare. Moleculele heteroduplex care se formează au cîte o catenă de la fiecare plasmidă originară (fig. 54). Cele două catene formează o moleculă

Fig. 54. — Heteroduplex plasmidial evidențiat schematic după o microelectrografie. Plasmidele *pI* 258 și *pI* 6187 sînt denaturate și catenele separate lăsate să se renatureze. Ele sînt identice, exceptînd faptul că prima poartă un Tn care specifică rezistența la eritromicină. Heteroduplexul are o catenă de la fiecare plasmidă.



dublu catenară perfectă, cu excepția unei bucle monocatenare, corespunzînd transpozonului, care este legat de rest printr-un scurt peduncul dublu catenar, format de secvențele terminale repetate invers (fig. 55). În forma cea mai simplă, *Tn* I, spre exemplu, este alcătuit dintr-o regiune internă corespunzînd genelor proprii, flancată la ambele extremități de cîte

o secvență nucleotidică cu orientare inversă, lungă de $\sim 800-1.500$ pb, reprezentată de o secvență de inserție sau de o structură similară. Ca urmare se poate considera că un Tn este un segment de ADN „mobil”,

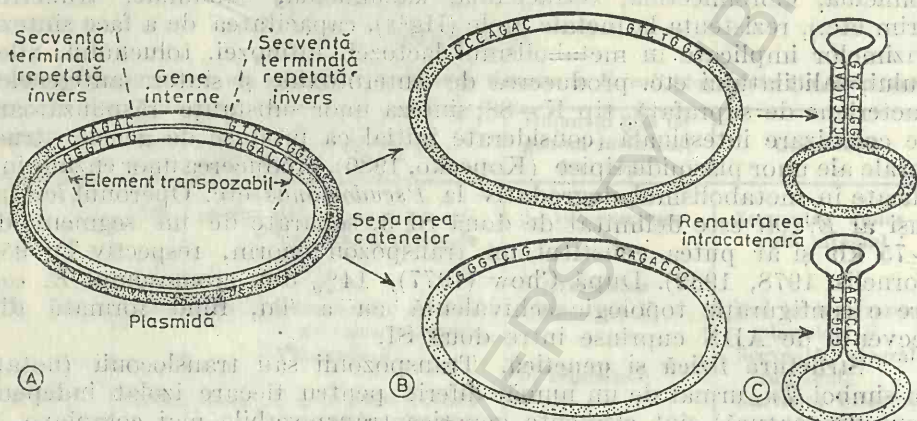


Fig. 55. — Evidențierea secvențelor repetate invers (cu simetrie rotațională) la extremitățile unui element transpozabil (A). Dacă cele două catene ale plasmidei care poartă un Tn sînt separate (B) și fiecare catenă este pusă în condiții de renaturare, nucleotidele de la extremități se leagă între ele pentru a forma un „trunchi” („stem”) d.c., în timp ce regiunea genelor interne apare ca o buclă m.c. (C) (după Cohen, 1980).

deoarece este flancat de secvențe de inserție tipice sau de secvențe derivate din acestea (Berg și Drummond, 1978; Ross și colab., 1979). Toți transpozonii caracterizați pînă în prezent din punctul de vedere al secvenței bazelor au o repetiție terminală inversă (tabelul nr. 15). Deoarece secvențele de inserție au ele înșile scurte terminații inverse, chiar transpozonii delimitați de două SI în ordine repetată direct (cum este Tn 9) este, de asemenea, flancat de repetiții inverse.

Fig. 56 prezintă structura genetică a transpozonului Tn 3, care include patru regiuni distincte corespunzînd: 1) genei structurale *bla*, care codifică sinteza enzimei β -lactamaza, răspunzătoare de rezistența la ampicilină și alte antibiotice înrudite; 2) genei structurale *tnp A* care codifică formarea transpozazei, enzima răspunzătoare pentru transpoziție; 3) gena *tnp R* pentru proteina represor, care controlează transcrierea genei *tnp A* și a propriei sale gene; 4) extremitățile repetate în ordine inversă (SRI), răspunzătoare de fenomenul de transpoziție (Cohen, 1980).

Prezența secvențelor terminale repetate în ordine inversă a fost evidențiată prin experiențe de hibridare moleculară a ADN și prin microelectronografie, datorită apariției unor structuri cu formă „trunchi și buclă” („stem and loop”, Cohen, 1980) sau de ciupercă (Cornelis, 1982). Datorită naturii antiparalele a celor două catene ale ADN, secvențele celor două SRI situate pe aceeași catenă sînt complementare unele față de altele. După separarea celor două catene prin denaturarea ADN se pot produce recombinații intracatenare la nivelul acestor secvențe, cu formarea unui „picior” dublu catenar, format prin împerecherea secvențelor complementare la nivelul SRI, în timp ce ADN cuprins între SRI formează o buclă sau ansă monocatenară (fig. 55).

În unele cazuri, secvențele repetate invers sînt și SI, în altele sînt numai secvențele terminale, repetate invers ale unor SI. În timp ce la Tn 3 ele au ~ 50 pb, la Tn 5 și Tn 10 au între ~ 150 și 700 pb.

Tabelul nr. 15

Caracteristicile principalilor transpozoni

Denumirea	Plasmida și bacteria-gazdă originală	Markerul genetic	Lungimea Tn	Lungimea SRI
Tn 1	RP4 <i>Pseudomonas</i>	Ap(TEM-2)	5,0 kb	scurtă
Tn 2	RSF 1030 <i>Salmonella</i>	Ap	5,0 kb	scurtă
Tn 3	R1-drd-19 <i>Salmonella</i>	Ap (TEM-1)	4 957 pb	38 pb
Tn 4	R1-drd-19 <i>Salmonella</i>	Ap, SM, Su	20,5 kb	scurtă
Tn 5	R 67 <i>Klebsiella</i>	Km (APH-II)	5,7 kb	1 450 kb
Tn 6	R 72 <i>E. coli</i>	Km	4,2 kb	
Tn 7	R 483 <i>E. coli</i>	Tp, Su	14 kb	
Tn 9	pSM 14 <i>Shigella</i>	Cm	2 638 pb	23 pb
Tn 10	R 100 <i>Shigella</i>	Tc	9,3 kb	1 400 pb
Tn 951	PGC1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	Lac	16,6 kb	41 pb

* Semnificația markerilor: Ap — ampicilină; TEM tip β — lactamază; Sm — streptomycină; Su — sulfamidă; Km — kanamicină; Tp — trimetoprim; Tc — tetracilină; Cm — cloramfenicol; Lac — lactază.

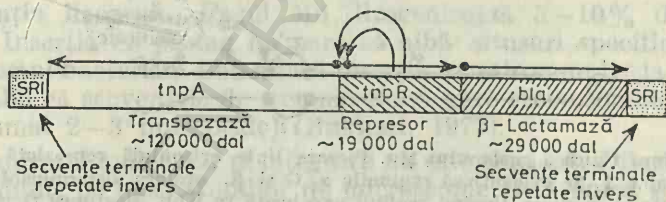


Fig. 56. — Reprezentarea schematică a transpozonului Tn 3. Săgețile indică direcția de transcriere a diferitelor regiuni ale ADN. Dimensiunile diferitelor segmente sînt arbitrare (după Cohen, 1980).

Transpozonii nu sînt găsiți în stare autonomă, ci numai ca părți ale unui replicon funcțional, în care se inseră ca segmente lineare de ADN cu extremități definite. Inserția oricăror gene între două elemente transpozabile face posibil transferul lor pe o moleculă de ADN neînrudită structural, prin recombinare neomologă. Experimental, spre exemplu, a fost urmărită transpoziția Tn 10 Tc (de rezistență la tetracilină) din poziția sa originală, într-o plasmidă R, în genomul fagului P 22 de la *Salmonella*, apoi de la acesta în genele structurale *leu* din cromosomul de *Salmonella* și, mai departe, succesiv, în genomul fagului λ *E. coli*, în operonul cromosomal *trp* al *E. coli* și din nou în fagul λ *E. coli*. Mai mult decît atît, s-a demonstrat că, în principiu, nu există nici o limită în setul de gene care

pot fi preluate de la un moment la altul în structura unui transpozon, deoarece elementele care îl flanchează pot fi translocate independent, determinând formarea de transpozoni noi, la întâmplare.

Fagul Mu

Unul din elementele genetice transpozabile cel mai mult studiate este fagul Mu, a cărui notorietate este legată de capacitatea sa de a se integra cu totul la întâmplare, producând frecvent mutații. Denumirea sa — *fag Mutator* de unde și simbolul Mu, ilustrează această proprietate.

Genomul fagului Mu este alcătuit dintr-o moleculă de ADN d.c. lineară, avînd ~ 25 Mdal (respectiv ~ 37 kbp). Structura sa fizică și genetică are unele particularități neobișnuite, decurgînd în primul rînd din prezența constantă la extremitățile sale a unor secvențe terminale, provenite din cromosomul celulei bacteriene în care a fost replicat și care diferă, ca lungime și compoziție chimică, în funcție de regiunea în care a fost integrat. Genomul fagic propriu-zis este alcătuit din trei regiuni funcțional distincte, notate cu α , G și β (fig. 57).

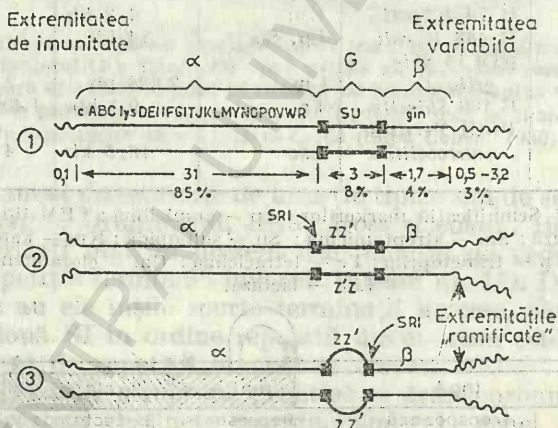


Fig. 57. Structura fizică a genomului Mu. Fiecare linie orizontală reprezintă o moleculă de ADN fagic m.c. 1. Se evidențiază regiunile α , G și β , ordinea determinanților genetici din structura lor și mărimea fiecărei regiuni exprimată în kbp. Regiunea G este marginită de secvențe terminale, repetate invers, reprezentate prin dreptunghiuri negre. Se observă extremitățile terminale variabile de natură bacteriană (liniile ondulate). 2, 3. Structuri dublu catenare (heteroduplex) rezultate din renaturarea diferitelor molecule de ADN Mu denaturate. Sunt evidențiate extremitățile variabile ramificate și formarea de bucle monocatenare în regiunea G, consecutiv inversiunii sale aleatorii (după Kopecko, 1980).

Segmentul α conține în total 23—24 de cistroni și este situat la capătul de imunitate al moleculei. El conține, pe lângă gena de imunitate *c*, care codifică sinteza unei proteine represor, gena de integrare *A* și gena de replicare *B*; genele *D*—*J*, care poartă informație pentru formarea capului fagic, și genele *K*—*S*, pentru formarea cozii. Segmentul α reprezintă $\sim 85\%$ (31 kbp) din lungimea genomului.

Segmentul G, reprezentînd $\sim 8\%$ din genom (~ 3 kbp), este flancat la ambele extremități de două secvențe de ADN mici (~ 20 — 50 pb), repetate în ordine inversă. Ele sînt răspunzătoare de caracterul aleatoriu al orientării segmentului G, deoarece furnizează suportul molecular necesar

pentru apariția de recombinări, care determină inversia acestui segment în cursul integrării sale ca profag (Symonds și Coelho, 1978). Datorită prezenței lor, orientarea segmentului G poate fi sau de la stînga spre dreapta sau de la dreapta spre stînga. Fenomenul are o importanță deosebită, deoarece specificitatea de gazdă și deci infecția fagică litică (vegetativă) este condiționată de o anumită orientare a regiunii G în genom. În orientarea *flip* sau G^+ , corespunzînd cazului în care ordinea determinantilor genetici în segmentul inversabil G este x, y, z , fagul Mu infectează *E. coli* K 12. În orientarea *flop* sau G^- , în care ordinea acelorasi determinantii este z, y, x , fagul nu mai poate infecta aceeași bacterie datorită unei adsorbții defective. El poate infecta însă litic bacteriile din genul *Serratia*, *Citrobacter* și tulpina C a *E. coli*. Printre particulele de fag Mu rezultate prin infecția celulelor sensibile ~ 99% sînt *flip*, iar prin inducția celulelor lizogene numai ~ 50%. Segmentul G include genele *S* și *U* a căror inversiune este controlată de funcția *gin*, codificată de segmentul β . Cînd segmentul G este inserat în ordine inversă pe catene diferite, regiunile neocomplementare formează în experiențele de denaturare — renaturare bucle monocatenare de substituție („substitution bubble”) evidente în moleculele omo- sau heteroduplex. Extremitățile genomului sînt formate din secvențe de ADN heterologe, avînd numai ~ 100 pb la capătul de imunitate (unde au fost evidențiate numai cu ajutorul unor tehnici rafinate) și lungimi mult mai mari la capătul opus (0,5—3,2 kbp, după Kopecko (1980); ~ 1,5 kbp, după Birge (1981). Heterogenitatea secvenței bazelor explică aspectul ramificat al heteroduplexului la extremitatea S (capătul variabil) al moleculei, unde formează secvențe terminale monocatenare „disociate” sau „ramificate” („split ends”). În ambele cazuri acestea sînt de proveniență bacteriană.

Evoluția lizogenă. Fagul Mu lizogenizează 5—10% din celulele infectate. Inserția ca profag nu pare să aibă situsuri specifice preferate în cromosomul bacterian. Chiar dacă inserția nu este complet la întîmplare, este probabil că secvențele de recunoaștere/legare cromosomale sînt foarte scurte (numai 2—3 nucleotide) (Bukhari, 1977).

Mecanismul molecular al integrării nu este elucidat. Diferitele modele propuse admit, pe baza studiilor de microscopie electronică și a analizei secvenței bazelor, că integrarea interesează numai secvențele adevărate virale (Hsu și Davidson, 1977). Niciodată nu s-a înregistrat integrarea secvențelor terminale heterologe (bacteriene) asociate cu fagul Mu autonom. Este probabil că profagul „le lasă să cadă” înainte de/sau în cursul procesului de integrare, pentru a le reface din nou, în cursul replicării și/sau al „împachetării” în capsidă, dar nu pe cale de recombinare genetică (Howe și Bade, 1975). După modelul lui Kopecko (1980) integrarea fagului Mu ar fi asemănătoare celei a fagului λ , cu deosebirea că situsurile de legare *att B* (bacteriene) ar fi extrem de numeroase, iar cele de recunoaștere/legare ale fagului Mu (*att P*) ar fi localizate pe genomul acestuia aproape de extremități, în vecinătatea secvențelor terminale de origine bacteriană (Giraud și Hirth, 1981).

Integrarea ar implica formarea unei structuri intermediare de integrare, în care extremitățile adevărate ale genomului fagic (situsurile *att P*) ar fi aduse în apropiere strînsă, fie pe calea legării lor covalente, fie prin

intermediul unei proteine. Integrarea ar fi corelată atât cu replicarea fagului Mu, cât și cu replicarea cromosomului bacterian (fig. 58). Molecula de ADN Mu infectant ar acționa ca matriță pentru replicarea propriilor sale secvențe nucleotidice. Moleculele nou replicate, mono- sau dublu

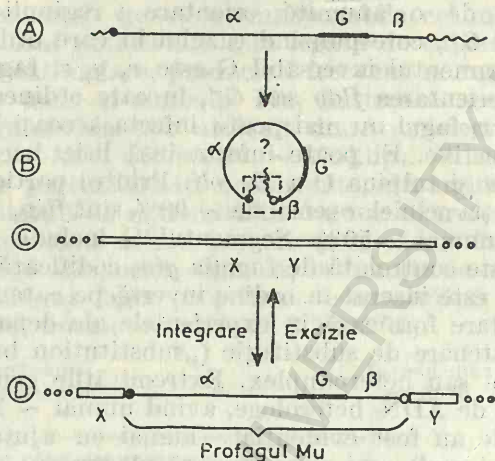


Fig. 58. — Reprezentarea ipotetică a integrării și exciziei exacte a fagului Mu. A. ADN d.c. linear Mu în forma prezentă în virion. ADN variabil bacterian asociat cu fiecare moleculă fagică matură este reprezentat ca o linie ondulată. Secvențele fagice α , β și G sînt reprezentate ca linii cu diferite grosimi. Secvențele de recunoaștere și legare Mu sînt notate cu O și ●. B. Structură intermediară ipotetică de integrare în care extremitățile adevărate ale genomului Mu (siturile *att*) sînt menținute apropiate (în pătratul punctat) probabil prin legătură covalentă sau printr-o proteină. Fagul Mu infectant poate replica numai secvențele proprii, nu și extremitățile eterogene. Structura nou replicată (m.c. sau d.c.) poate fi intermediarul de integrare. C. Porțiune dintr-un cromosom bacterian, plasmidă sau genom fagic. D. Integrarea fizică a ADN Mu determină inserția lineară numai a secvențelor proprii în cromosomul bacterian. Deși Mu poate fi inserat în fiecare din cele două orientări fizice, hărțile fagului vegetativ și ale profagului sînt colineare. Excizia precisă a ADN Mu implică fie inversarea întregului proces, fie un proces de recombinare bacteriană Rec-independentă (după Kopecko, 1980).

catenare, ar putea forma structuri circularizate cu viață scurtă, care ar favoriza schimbul prin recombinare fag-bacterie și ar asigura integrarea propriu-zisă, lineară, a segmentelor α , G și β în cromosomul receptor. Deși fagul Mu se poate integra în fiecare din cele două orientări fizice posibile, hărțile profagului și fagului vegetativ sînt colineare (au aceeași ordine lineară a determinantilor genetici). După Girard și Hirth (1980), integrarea ar fi un fenomen „vital” pentru fagul Mu, în sensul că dacă nu se integrează nu se poate replica. Excizia precisă a fagului Mu ar implica, după acest model, reproducerea inversă a procesului de integrare. Atît inserția, cât și excizia profagului, ca și toate celelalte procese de recombinare induse, nu necesită intervenția sistemelor de recombinare normale, celulare, ci sînt integral dependente de inserția unui sistem de recombinare „nelegitimă” specifică fagului (Ljunquist și colab., 1979).

Modelul de integrare propus de Collins (1976) consideră, de asemenea, integrarea fagului Mu ca un eveniment legat de replicare, în care schimbul de material genetic are loc între un situs dispus la întîmplare pe cromoso-

mul bacterian și un situs specific pe genomul fagic. Inserția este însoțită de o mutație.

Modelul lui Grindley și Sherratt (1978) consideră că integrarea este, de asemenea, corelată cu replicarea și ar fi precedată de producerea unor breșe monocatenare în genomul fagic și a unor breșe decalate („staggered”) în ADN bacterian (fig. 59). După legarea catenei de ADN fagic Mu de ADN bacterian ar urma replicarea ADN și reîntoarcerea catenei de ADN la genomul Mu original.

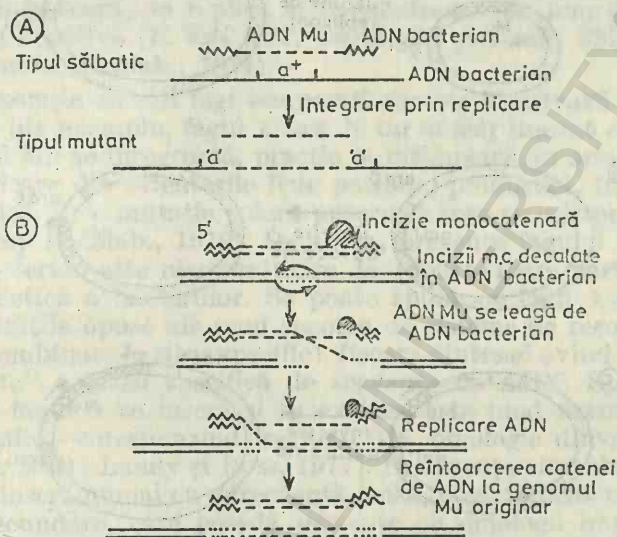


Fig. 59. — A. Mecanismul de inserție a fagului Mu 1 și de producere a mutației $a^+ \rightarrow a^-$. Schimbarea are loc la întimplare pe cromosom și la un situs specific pe genomul fagic (după Collins, 1976). B. Modelul de integrare a fagului Mu însoțit de replicarea ADN (după Grindley și Sherratt, 1978).

Evoluția litică a fagului Mu implică exprimarea integrală a informației genetice, cu sinteza proteinelor structurale, încapsidarea genomului, începând cu capătul de „imunitate”, moartea bacteriilor-gazdă și eliberarea a ~ 50—100 virioni infecțioși/celulă.

Replicarea fagului Mu este puțin cunoscută. După cei mai mulți autori, ar putea avea loc *in situ*, respectiv în stare integrată (neexcizat) în cromosomul bacterian, unde ar fi copiat de ADN-polimerază. Nu se știe dacă genomurile fagice sunt excizate și „împachetate” direct din cromosomul bacterian sau dacă apar ca molecule mari, circulare, de diferite dimensiuni, superhelicale, alcătuite din ADN Mu și ADN bacterian.

Efectele prezenței fagului Mu. Datorită capacității sale de a se deplasa continuu, de a se insera practic în orice locus cromosomal, în fiecare din cele două orientări posibile, și de a se replica *in situ*, fagul Mu produce o mare varietate de rearanjări aberante ale cromosomului gazdei, care obișnuit nu apar în absența sa sau sunt observate numai cu o frecvență foarte mică, în așa fel încât scapă observației (Toussaint și colab., 1977).

Ele includ procese de fuziune de repliconi, deleție și inversie a regiunilor adiacente situsurilor de integrare, transpoziții etc. (fig. 60).

Studiile efectuate pe *E. coli* au arătat, în plus, că mutațiile induse de fagul Mu, prin inserția sa în zona afectată, sînt puternic polare, provo-

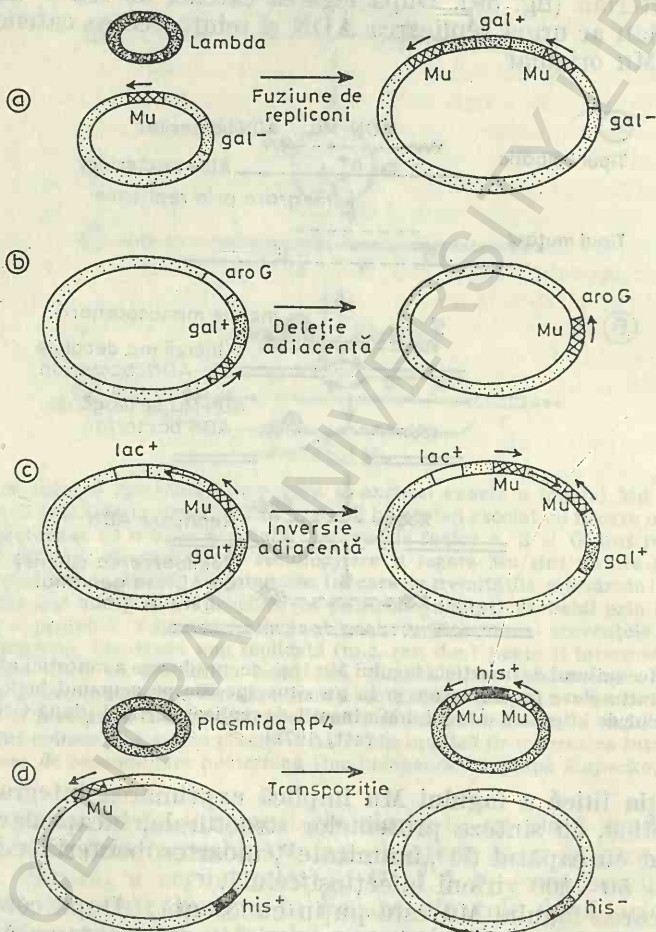


Fig. 60. — Rearanjările cromosomale mediate de fagul Mu includ fuziunea de repliconi, deleția adiacentă, inversia adiacentă și transpoziția segmentelor cromosomale pe o plasmidă. Săgețile mici indică orientarea fagului integrat. a. Integrarea fagului λ_{gal^+} în cromosom între două copii de Mu la o bacterie Mu lizogenă. b. Deleția genelor gal^+ într-o celulă lizogenă în care fagul Mu a fost integrat în vecinătatea lor. c. Inversia regiunii „origine” a cromosomului bacterian între două copii orientate invers ale ADN Mu la o bacterie mascul lizogenă. d. Transpoziția genelor his^+ cromosomale pe o plasmidă între două copii ale fagului Mu (după Cohen, 1980).

cînd inactivarea tuturor genelor operonului respectiv, situate distal față de punctul de inserție (Howe și Bade, 1975). Frecvența mutațiilor intra-genice este de 50–100 ori mai mare decît frecvența mutațiilor spontane

(Kopecko, 1980). Aceste mutații sînt extrem de stabile, frecvența reversiei fiind de ordinul a 10^{-9} per celulă viabilă (Jordan, 1968).

Rolul fagului Mu în evoluția bacteriilor. Fagii temperați au un spectru de gazde limitat la unul sau două genuri, datorită, pe de o parte, faptului că numai un număr limitat de specii posedă receptorii de suprafață pe care se pot fixa și, pe de alta, incapacității fagilor odată injectați de a se replica sau integra ca profagi. Spre deosebire de comportarea generală a fagilor temperați, fagul Mu (datorită capacității sale de tranziție flip-flop) infectează, se replică și lizogenizează un număr mare de bacterii Gram-negative (*E. coli* K12, *Citrobacter freundii*, *Shigella dysenteriae* etc.), (Denarie și colab., 1977).

În opoziție cu alți fagi temperați care se integrează de regulă la un situs unic (de exemplu, fagul λ) sau la un număr limitat de situsuri (fagul P22), fagul Mu se integrează, practic la întimplare, în orice situs cromosomal, în oricare din orientările fizice posibile, producînd, fie o simplă inactivare genică, fie o mutație polară puternică într-un operon (Hull și colab., 1979; Kamp și colab., 1979). De aceea, prezența fagului Mu într-un cromosom bacterian este răspunzătoare de o foarte mare parte din „flexibilitatea” genetică a bacteriilor. Se poate spune că fagii λ și Mu se găsesc la extremitățile opuse ale unui spectru de sisteme de recombinare specializată (recombinare la situs specific), fiecare dintre ei avînd capacitatea de a „recunoaște” o clasă specifică de secvențe de ADN. Spre deosebire de fagul Mu, fagul λ se inseră și se excizează în mod normal la un singur situs specific, corespunzînd regiunii de omologie dintre *att B* și *att P* (Campbell, 1962; Landy și Ross, 1977). În absența situsului *att B* normal, fagul λ se inseră numai cu o frecvență joasă, nesemnificativă, în numeroase situsuri secundare, care posedă secvențe cu omologii imperfecte față de situsul *att P*-fagic (Christie și Platt, 1979). Acceptînd ideea că sistemele complexe au evoluat prin asamblarea sistemelor mai simple, se poate admite că fagul λ a fost la origine un element genetic transpozabil, care a evoluat, dobîndind capacitatea de replicare independentă și de „împachetare” într-o capsidă. Efectul selecției în vederea unei integrări și excizii eficiente a determinat limitarea la un singur situs fix de integrare recunoscut de sistemele proteice de integrare și excizie, care au dezvoltat un grad înalt de specificitate (Campbell, 1979).

Proprietățile generale ale elementelor genetice transpozabile și consecințele prezenței lor.

Transpoziția

Transpoziția implică integrarea sau inserția într-un genom a unui EGT provenind din aceeași moleculă de ADN sau din alta prezentă în aceeași celulă. Integrarea are loc în absența omologiei genetice (cel puțin în raport cu secvențe de ADN cu o anumită lungime) și evoluează independent de produsul genei *rec A*, care asigură recombinarea genetică clasică (Kleckner, 1977; Cornelis, 1982).

Procesul de transpoziție, care este precedat de excizia EGT din genomul original în care se găsea, are câteva caracteristici esențiale:

1) El nu constă într-un schimb de material genetic, ci într-o adădire de ADN.

2) Transpoziția unui EGT la un nou situs nu duce la pierderea EGT situat la situsul original, deoarece la noul situs se inseră, în ultimă instanță, o copie a EGT (fig. 61).

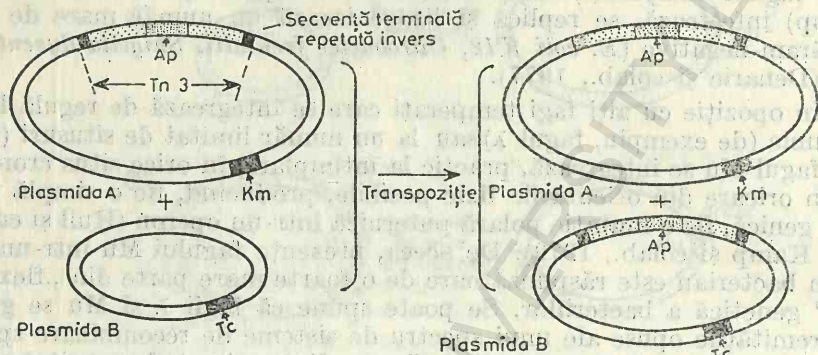


Fig. 61. — Tn 3, care poartă gena Ap^R , face parte inițial din plasmida A care mai conține gena Km^R . Transpoziția unei copii a lui pe plasmida B (cu gena Tc^R) determină formarea unei plasmide B, care conține genele Ap^R și Tc^R (după Cohen, 1980).

3) Deși transpoziția are loc în situsuri multiple, în molecula de ADN receptor inserția nu se face la întâmplare, ci cu o specificitate variabilă între slabă și moderată. Face excepție fagul λ , care în mod normal se inseră foarte specific, datorită existenței unor situsuri specifice atât în cromosomul *E. coli* (*att B*), cât și în cel fagic (*att P*) și fagul Mu-1, care posedă un situs pe genomul viral, ce se poate integra practic în orice situs cromosomal. La *E. coli*, inserția unor Tn (Tn 5, Tn 10) se face cu o specificitate slabă, probabil datorită distribuției largi a situsurilor posibile de inserție. Cu toate acestea, Wu și Cohen (1980) au demonstrat că unui Tn nu se inseră la întâmplare, ci în anumite regiuni, nu foarte compacte zone (specificitate regională sau locală) ale ADN s-ar datora bogăției locale în A + T a ADN și omologiei între el și Tn 3. Existența unor „zone calde” („hot spots”) favorabile pentru inserția Tn arată că recunoașterea unor secvențe nucleotidice homologue poate juca un rol important în determinarea frecvenței și specificității de situs a integrării Tn.

4) Nu se cunosc încă enzimele, necesitățile energetice și structurale care determină fenomenul de transpoziție. Face excepție Tn 3, la care s-a demonstrat intervenția a două enzime *transpozaza* și *rezolvaza*, codificate de informația genetică proprie transpozonului.

5) Capacitatea EGT de a se integra într-un număr mare de situsuri în genomul bacterian a sugerat ideea că transpoziția este determinată de sisteme de recombinare diferite de cele implicate în recombinarea genetică generală la bacterii. Prezența sa la bacteriile *rec A*⁻, la care recom

binarea bazată pe omologie genetică (recombinarea „legitimă” sau „legală”) a fost anulată prin mutație, a dus la ideea intervenției unui mecanism de recombinare neomologă sau neligitimă.

Consecințele procesului de transpoziție

Elementele transpozabile sînt răspunzătoare de o serie de modificări genetice, deoarece determină mutații, deleții, inversiuni, transversii etc. Prezența și efectele lor explică bazele moleculare ale fenomenelor de instabilitate genetică, ce au încurcat și intrigat pe geneticienii de mai multe decade (Shapiro, 1983; Weinert și colab., 1983).

Duplicarea. Inserția tuturor EGT produce o duplicare a 5, 9 sau 11 pb la punctul de inserție în ADN receptor, care sînt repetate în ordine directă, încadrînd de ambele părți elementul inserat. Natura bazelor respective este diferită de la un situs de inserție la altul. Fig. 62 prezintă

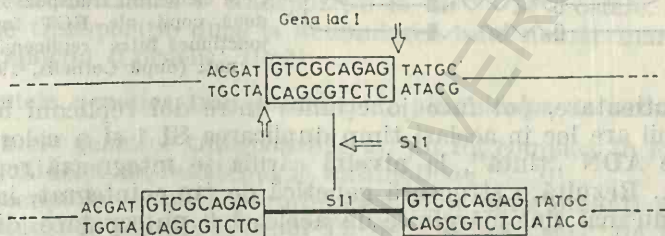


Fig. 62. — Consecințele moleculare ale integrării secvențelor de inserție. Inserția SI 1 în gena *lac I* produce o secvență de 9 pb repetată direct, la fiecare extremitate a elementului inserat. O copie a celor 9 pb preexistă în gena de tip sălbatic anterior integrării (după Calos, 1980).

modul de duplicare a 9 baze, după inserția SI 1 în gena *lac I*. Inițial, cele două catene ale ADN receptor sînt clivate la situsuri decalate, distanțate unul de celălalt prin 9 nucleotide. Completarea ulterioară prin biosinteză a catenelor, de fiecare parte a EGT nou inserat, prin legarea nucleotidelor complementare, explică apariția secvențelor duplicate.

Caraacterul mutagen. Transpoziția este un fenomen mutagen, proprietate care a permis chiar identificarea și izolarea EGT. Inserția intragenică a unui EGT determină suprimarea funcției genei respective. Majoritatea mutațiilor produse de EGT sînt *mutații polare*. Descrise de Franklin și Luria (1961) și caracterizate de Martin (1969) ca mutații non-sens, mutațiile polare au, pe lângă proprietatea de a suprima funcția genei mutate, și capacitatea de a diminua funcția genelor situate distal față de sediul mutației. De regulă, mutațiile polare spontane sau cele induse de agenții mutageni produc o scădere moderată a expresiei genelor distale.

Mutațiile polare induse de EGT (SI 1, SI 2, SI 3, Tn 3, Tn 5, Tn 10 și de fagul Mu) inserate într-un operon diferă de cele spontane printr-o serie de particularități: 1) au o frecvență mare; 2) gradul de polaritate este foarte ridicat; sînt mutații polare puternice, deoarece sinteza reziduală a produșilor genelor distale față de locul inserției este fie complet absentă, fie cel mult abia detectabilă; 3) revin spontan la tipul sălbatic, dar rata reversiei nu este mărită de agenții mutageni.

Fuziunea de repliconi. EGT au proprietatea de a determina în urma inserției fenomene de fuziune între repliconi. Procesul a fost studiat în cazul SI 1 de Ohtsubo și Zenilman (1980), dar a fost descris și în alte multe cazuri. Fig. 63 explică modul în care două copii ale SI 1, dispuse

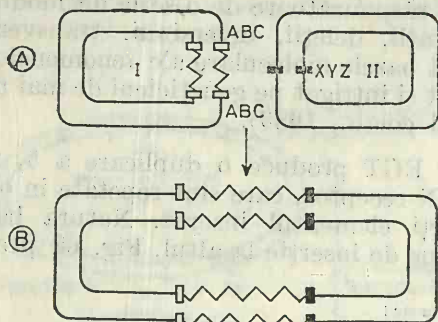
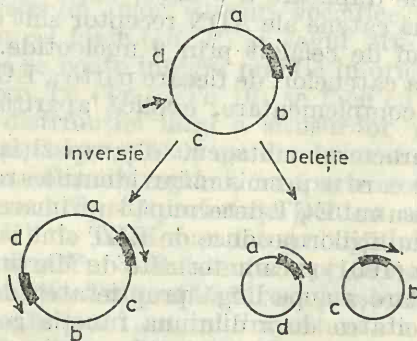


Fig. 63. — Fuziunea repliconilor I și II sub acțiunea unui element genetic transpozabil (EGT), reprezentat prin linia în zigzag. A. Literele ABC reprezintă câteva perechi de baze ale repliconului I, care au fost dedublate în cursul inserției EGT. Literele XYZ reprezintă câteva perechi de baze ale repliconului II, la nivelul căruia a fost inserat repliconul I. B. Structura cointegrată formată. Nucleotidele XYZ sînt dedublate, ca și elementul transpozabil. Cele două copii ale EGT formează joncțiunea între repliconii fuzionați (după Cornelis, 1982).

în aceeași orientare, pot face joncțiunea între doi repliconi identici. În cazul fuziunii are loc în același timp duplicarea SI 1 și a celor 9 perechi de baze ale ADN „țintă”, la nivelul căruia se integrează repliconul ce poartă SI 1. Rezultă o structură genetică de tip cointegrat, în care cele două SI 1 nu mai sînt mărginite de aceleași 9 pb repetate direct (Cornelis, 1982).

Producerea de deleții și inversiuni. Toate elementele transpozabile au, în grade diferite, capacitatea de a induce apariția de deleții și inversiuni (fig. 64).

Fig. 64. — Modelul lui Shapiro, de producere a delețiilor și inversiunilor prin intermediul elementelor genetice transpozabile (EGT). Inserția unei copii EGT între c și d (→) produce inversia segmentelor b și c (stînga). Într-o altă orientare are loc fuziunea EGT cu segmentele a și d și deleția segmentelor c și b care se leagă de o copie a EGT (dreapta) (după Calos și Miller, 1980).



S-a demonstrat că SI 1 este foarte deletogenă în comparație cu alte EGT. Deleția începe, de regulă, la una din extremitățile elementului transpozabil și se termină de preferință la nivelul unor situsuri care constituie „puncte calde” pentru inserția elementului corespunzător. Este probabil că deleția este produsă de aceleași enzime care participă în excizie. Elementele genetice transpozabile produc frecvent inversiuni ale unor segmente de ADN, în cursul fenomenului de transpoziție. Zona

inversată este totdeauna mărginită de cite o copie a EGT la fiecare extremitate, dispuse în sens invers una față de cealaltă (Calos și Miller 1980; Cornelis, 1982).

Pe lângă aceste funcții, EGT pot afecta exprimarea unor gene învecinate, datorită semnalelor de stop și start pe care le poartă, codificând inițierea și terminarea transcrierii genetice, acționind ca adevărate „comutatoare” supranumerare care reglează funcționarea diferitelor gene.

Frecvența transpoziției. După Kleckner (1977), fenomenul transpoziției evoluează cu o frecvență medie de 10^{-4} . Kopecko (1980) consideră că frecvența variază între 10^{-1} și 10^{-7} evenimente/celulă, în funcție de natura celulei-gazdă (spre exemplu, tulpina AB 1157 de *E. coli* scade frecvența caracteristică pentru *E. coli* K12), de situsurile receptoare cromosomale și de natura Tn însuși. În condiții optime, Tn 5 este capabil de o transpoziție la fiecare 10–100 celule (Davis și colab., 1977). În schimb, Tn 10 realizează o transpoziție la 10^{-6} – 10^{-7} celule. Repetarea procesului de transpoziție duce la acumularea unui număr mare de EGT pe același replicon (Cornelis, 1982):

Elementele genetice transpozabile ale plasmidelor de rezistență

Elementele genetice transpozabile au un rol complex în formarea și evoluția plasmidelor de rezistență la antibiotice:

1) Prezența lor explică proprietatea unor determinanți genetici de rezistență incluși în unități de tipul Tn de a putea „sări” de la un situs genetic la altul, în așa fel încît pot fi găsiți inițial în structura unei plasmide, apoi succesiv într-un genom fagic, în cromosomul bacterian, din nou într-o plasmidă ș.a.m.d. (Hedges și A. F. Jacob, 1974; Franklin, 1975). Elementele de tipul SI, prezente în genomurile din aceeași celulă, furnizează secvențele necesare pentru producerea acestor recombinări genetice succesive.

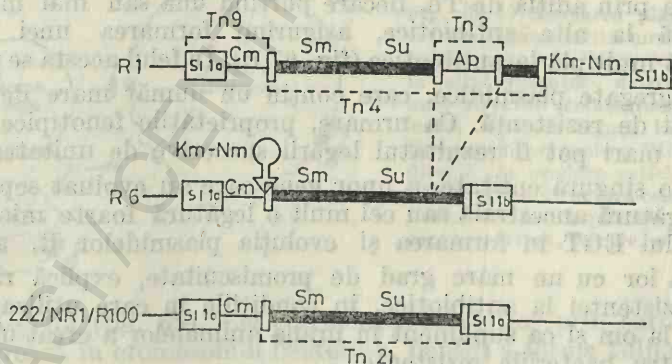


Fig. 65. — Relațiile regiunilor *r* (determinanți genetici ai rezistenței la antibiotice) cu secvențele de inserție (SI) la plasmidele R 1, R 6 și R 22 (NR 1, R 100): Cm — cloramfenicol; Sm — streptomycină; Su — sulfamidă; Km — kanamicină; Nm — neomicină (după Kopecko, 1980).

2) Ptashne și Cohen (1975), studiind plasmidele R 1, R 100 și R 6 (fig. 65, 66), au arătat că joncțiunea dintre segmentul care determină capacitatea de transfer (FTR) și cel al determinanților rezistenței (*det-r*)

este realizată prin intermediul a două SI 1. Aceasta explică la nivel molecular fenomenul de disociere a unor plasmide mari, observat la *P. mirabilis*. Cele două SI permit separarea reversibilă a plasmidei mari în două elemente genetice mai mici, corespunzând *FTR* și plasmidei *det-r* care poartă fiecare o SI (fig. 67 A).

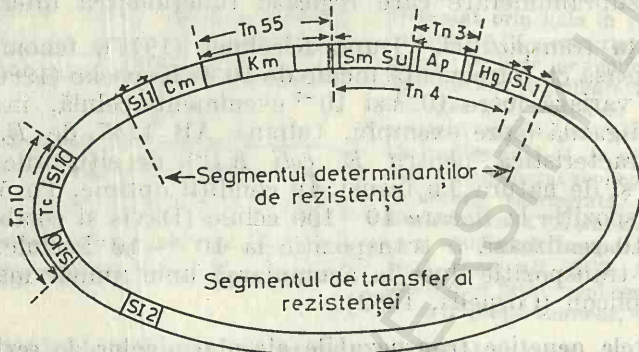


Fig. 66. — Rolul EGT în evoluția plasmidelor de rezistență la antibiotice. Schema evidențiază prezența SI 1 între segmentul determinant de rezistență și cel de transfer, care uneori se pot disocia reversibil. Genele de rezistență la cloramfenicol (Cm), kanamicină (Km), streptomicină (Sm), sulfonamide (Su), ampicilină (Ap) și Hg sunt grupate pe segmentul de rezistență, alcătuit din mai multe EGT. Tn 10, care conferă rezistență la tetraciclină (Tc), este situat pe segmentul de transfer, iar Tn 3 este inclus în Tn 4. Fiecare Tn poate fi transferat independent (după Cohen și Shapiro, 1980).

3) Elementele transpozabile furnizează un mecanism molecular de amplificare a segmentului determinant de rezistență la antibiotice, care poate evolua prin adăugarea de Tn, fiecare purtând una sau mai multe gene de rezistență la alte antibiotice, asigurând formarea unei plasmide de rezistență multiplă la antibiotice (fig. 67 B). În felul acesta se pot forma adevărate agregate plasmidice, care conțin un număr mare de SI și de determinanți de rezistență. Ca urmare, proprietățile fenotipice ale unor plasmide R mari pot fi rezultatul legării succesive de unitatea de bază (*FTR*) într-o singură entitate, a unor gene care au evoluat separat și nu au nici o legătură ancestrală sau cel mult o legătură foarte mică. Descoperirea rolului EGT în formarea și evoluția plasmidelor R, asociat cu transmiterea lor cu un mare grad de promiscuitate, explică răspândirea rapidă a rezistenței la antibiotice, în condițiile în care utilizarea lor în terapeutică la om și ca supliment în hrana animalelor a creat un avantaj selectiv pentru bacteriile rezistente.

Rolul EGT în procesele de sexualitate bacteriană. Elementele genetice transpozabile pot genera o serie de fenomene de cointegrare (fig. 68) și excizie a două molecule de ADN care pot exista autonom. Un exemplu este cel reprezentat de integrarea cromosomală a plasmidelor cu funcție episomală, cum sunt plasmidele F și R și de posibilitatea excizării lor, urmată de trecerea în stare autonomă.

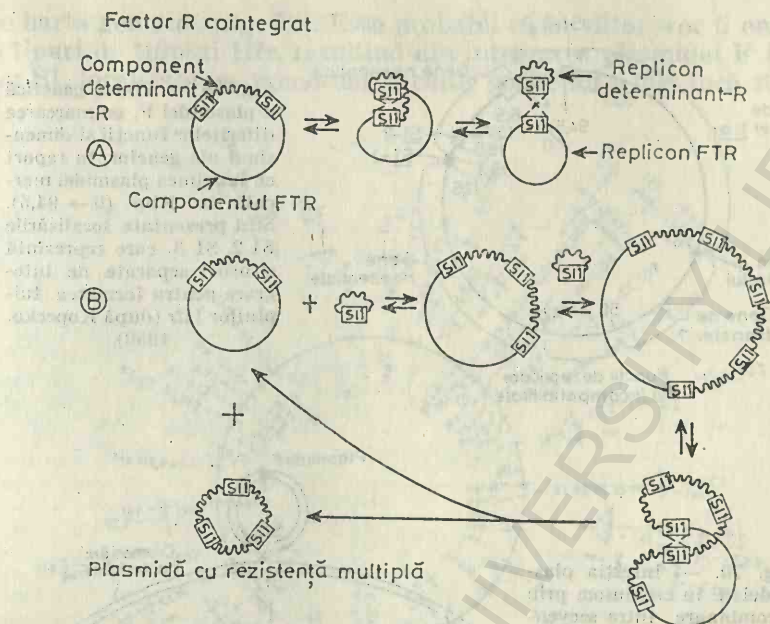


Fig. 67. — Mecanismul ipotetic al disocierii reversibile a plasmidelor R cointegrate la nivelul SI. Modelul explică formarea repliconilor FTR și a determinantilor R independenți (A) și producerea determinantilor R poligenici de rezistență multiplă (B) (după Ptashne și Cohen, 1975).

Rolul EGT în formarea bacteriilor Hfr. Plasmida F poartă în structură, pe lângă genele de replicare și de transfer, o regiune reprezentând $\sim 1/5$ din genom în care sînt localizate secvențele de inserție SI 2, SI 3

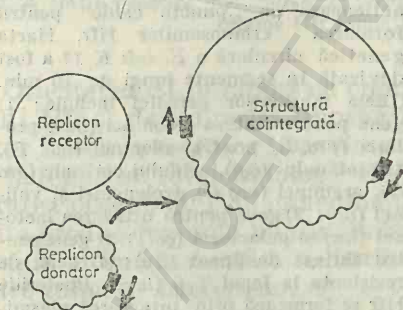


Fig. 68. — Formarea plasmidelor cointegrate. Transpoziția unui EGT (drept-unghi negru) de la un replicon donator la altul receptor determină formarea unei structuri cointegrate care conține ambii repliconi legați, la fiecare joncțiune, printr-o copie a EGT în orientare directă. Se produce astfel o nouă copie a EGT. De la structura cointegrată se pot forma din nou repliconii donator și receptor purtînd, fiecare, o copie a EGT.

și gama-delta (fig. 69). Ele corespund situsurilor prin care plasmidele F se integrează în cromosomul bacterian, pentru a forma tulpini ♂, de tipul Hfr (Davidson și colab., 1975), (fig. 70). La rîndul său, cromosomul bacterian conține în structura sa o serie de unități similare de tipul SI 2, SI 3, gama-delta (fig. 71).

Tulpinile Hfr se formează prin integrarea unei plasmide F autonome în cromosom. Recombinarea reciprocă integrativă dintre plasmida F și cromosomul bacterian se face la nivelul unor SI omologe, prezente pe cei doi repliconi (fig. 70) printr-un proces independent de sistemele *Rec* celu-

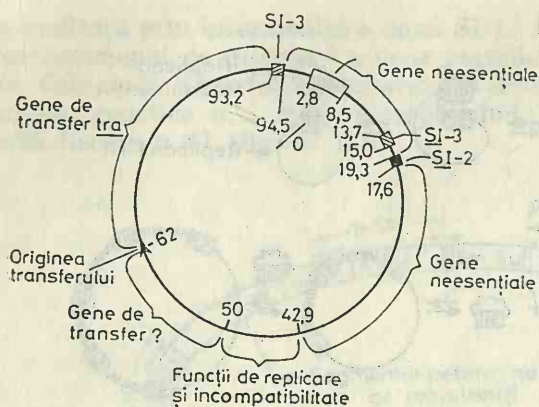


Fig. 69. — Harta genetică a plasmidei F, cu marcarea diferitelor funcții și dimensiuni ale genelor, în raport cu lungimea plasmidei marcată în Kbp (0 → 94,5). Sunt prezentate localizările SI 2, SI 3, care reprezintă situri separate de integrare pentru formarea tulpinilor Hfr (după Kopecko, 1980).

Fig. 70. — Inserția plasmidei F în cromosom prin recombinare între secvențe de inserție omologe.

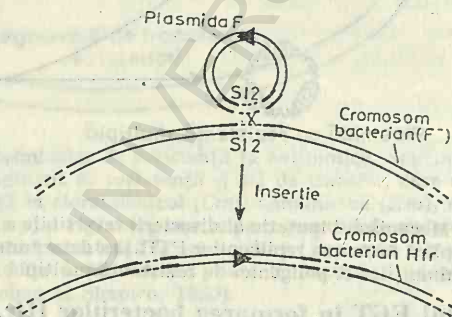


Fig. 71. — Secvențele de inserție (SI) acționează ca „puncte calde” pentru formarea cromosomilor Hfr. Harta genetică circulară a *E. coli* K 12 a fost divizată în segmente lungi de 10 min. Cheia markerilor genetici include: 1) gene pentru sinteza treoninei (*thr*), prolinei (*pro B*, *pro C*), adeninei (*pur E*), triptofanului (*trp*), acidului corismic (*aro C*), argininei (*arg G*), izoleucinei și valinei (*ilv*); 2) gene pentru utilizarea lactozei (*lac*) și galactozei (*gal*); 3) gene pentru sinteza de lipoat (*lip*); 4) gena de rezistență la fagul T 6 (*tax*). Bacteriile Hfr se formează prin integrarea plasmidelor F autonome, după legarea complementară a SI din structura lor cu SI omologe cromosomale. Polaritatea transferului Hfr este o consecință directă a orientării secvențelor omologe pe molecula parentală (după Kopecko, 1980).

lare (Davidson și colab., 1975). Acest mecanism are drept consecință distribuția neîntâmplătoare a originilor de transfer ale cromosomilor.

La *E. coli* au fost evidențiate până în prezent 27 de tulpini Hfr diferite, formate prin integrare la nivelul uneia din secvențele de inserție locali-

zate pe harta genetică (fig. 72). Este probabil că în viitor vor fi cunoscute și alte tipuri de tulpini Hfr, rezultând din integrarea plasmidei F la nivelul altor SI, localizate pe cromosom, a căror poziție nu a fost încă stabilită.

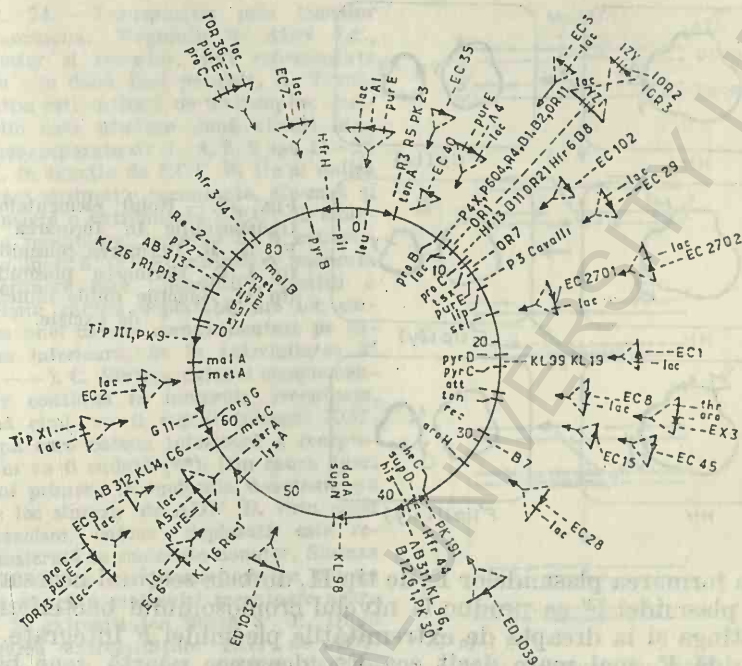


Fig. 72. — Harta genetică a *E. coli* K 12 prezentind localizarea aproximativă a punctelor de origine Hfr (după Brooks-Low, 1972).

Orientarea SI în raport cu cromosomul bacterian explică polaritatea tulpinii Hfr și deci direcția transferului de material genetic, de la celula donator la celula receptor (Davidson și Hu, 1975). Prin acest mecanism, EGT îndeplinește rolul fiziologic de a media formarea tulpinilor Hfr, prin integrarea plasmidei F în cromosomul bacterian. Natura mobilă a SI permite producerea unui număr mare de tulpini Hfr diferite, fapt care asigură în ultimă instanță o redistribuire echilibrată a patrimoniului genetic între tulpinile bacteriene.

Rolul EGT în formarea bacteriilor F'. Formarea bacteriilor F' are loc printr-un proces analog celui descris în cazul fagilor transductori specializați, care pot să piardă din propriul lor genom și să se îmbogățească cu ADN de proveniență bacteriană, printr-un proces de recombinare nelegitimă (Franklin, 1971). Au fost descrise două tipuri de plasmide F notate F' I și F' II.

În cazul plasmidelor F' tip I analogia cu fagul transductor λ , spre exemplu, este completă. Una din cele două secționări ale ADN cromosomal Hfr, necesare pentru a exciza plasmida F', are loc la nivelul plasmidei F, iar cealaltă la nivelul cromosomului bacterian, într-o zonă

adiacentă plasmidei, situată la stînga sau la dreapta acesteia (fig. 73). Rezultă o plasmidă F' , care conține cîteva secvențe din cromosomul bacterian, dar este lipsită de cîteva secvențe din propriul său ADN.

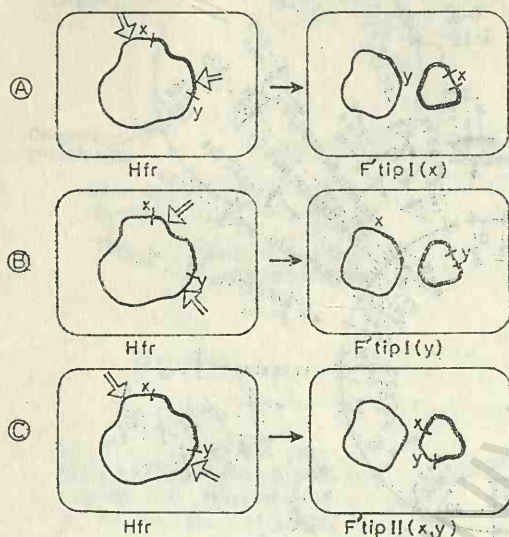


Fig. 73. — Rolul elementelor genetice transpozabile în formarea bacteriilor F' . A. B. Formarea plasmidelor F' de tip I. C. Formarea plasmidelor F' de tip II. Săgețile duble indică situsurile de excizie.

În formarea plasmidelor F' de tip II, ambele secțiuni necesare pentru excizia plasmidei F' se produc la nivelul cromosomului bacterian, respectiv la stînga și la dreapta de extremitățile plasmidei F integrate. Rezultă o plasmidă F , mai mare decît cea F^+ , deoarece poartă gene bacteriene de ambele sale părți (fig. 73 C).

Mecanismul molecular al transpoziției

Deși mult studiat în ultimii ani, mecanismul molecular al transpoziției este încă necunoscut. Pe baza modificărilor consecutive inserției EGT au fost elaborate mai multe modele, care încearcă să explice acest proces.

Modelul lui Grindley și Sherratt (1979)

Acest model mai este numit și *modelul transferului monocatenar* (fig. 74) :

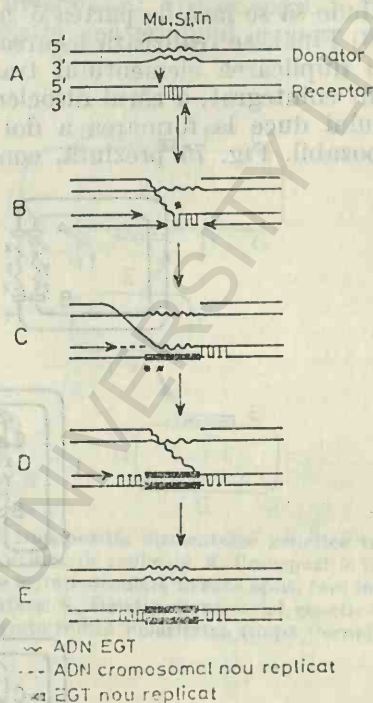
1) Transpoziția ar fi inițiată de un complex enzimatic, care produce două clivări monocatenare opuse, separate de 3–4, 9 sau 11–12 pb, în funcție de unitatea transpozabilă (fig. 74 A).

2) Ulterior, un al doilea complex enzimatic recunoaște, clivează și transferă o extremitate a elementului transpozabil la molecula receptor, unde este legată la extremitatea S' (marcată cu un asterisc, fig. 74 B).

3) Pe măsură ce molecula receptor este „deschisă” pentru a putea găzdui catena transferată începe sinteza catenei complementare pe catena receptor, de la extremitatea punctată (vezi linia întreruptă). Sinteza cate-

nei complementare continuă în molecula receptor până cînd întregul element transpozabil este copiat, după care are loc legarea catenei inferioare a ADN receptor (marcată cu asterise, fig. 74 C).

Fig. 74. — Transpoziția prin transfer monocatenar. Regiunile de ADN d.c., donator și receptor, sînt reprezentate prin cîte două linii paralele. A. Transpoziția este inițiată de un complex enzimatic care produce două clivări m.c. opuse, separate de 3—4, 5, 9 sau 11—12 pb., în funcție de EGT. B. Un al doilea sistem enzimatic recunoaște, clivează și transferă o extremitate a EGT la molecula receptoare, legînd-o de o extremitate liberă 5' (*). Pe măsură ce molecula receptoare este „deschisă”, pentru a accepta catena deplasată, are loc sinteza unei catene complementare pe catena inferioară, de la extremitatea 3' (---). C. Sinteza catenei complementare continuă în molecula receptoare, pînă cînd va fi copiat întregul EGT, după care catena inferioară a receptorului va fi sudată (**). Din cauza lipsei unui primer, în molecula donatoare nu are loc sinteza de ADN. D. Prin acest mecanism, catena deplasată este retransferată în molecula donator. Sinteza unei catene complementare pe catena superioară a moleculei receptoare apare de la extremitatea liberă 3'. E. După legarea extremităților EGT de ADN cromosomal adiacent, EGT al donatorului este integral păstrat (după Grindley și Sherratt, 1979).



4) Din cauza lipsei unei molecule „primer”, în molecula donor nu are loc sinteza unei catene complementare, de aceea, catena care a suferit transpoziția este transferată la molecula de ADN donator, unde începe sinteza catenei complementare, pe catena superioară a receptorului de la capătul liber 3' (fig. 74 D).

5) După legarea extremităților EGT de ADN cromosomal adiacent, unitatea transpozabilă donator este integral conservată (fig. 74 E).

Pentru a explica duplicarea citorva perechi de baze, modelul postulează că secționările celor două catene ale repliconului „țintă” sînt decalate. El leagă transpoziția de replicarea elementului transpozabil și a citorva perechi de baze care separă cele două secțiuni monocatenare.

Modelul Shapiro, Arthur și Sherratt

Shapiro (1979), precum și Arthur și Sherratt (1979) au propus, independent, două versiuni aproape identice ale modelului inițial. Premisele de bază ale acestui model sînt următoarele:

1) Secționarea celor două catene ale ADN „țintă” cu un decalaj de 4, 5, 9 sau 11 pb.

2) Secționarea celor două catene ale ADN aparținând repliconului donator, pentru o catenă *înaintea* și pentru cealaltă *după* elementul transpozabil, dar în așa fel încît polaritatea acestei clivări să fie inversă în raport cu aceea a secționării ADN „țintă” (spre exemplu, dacă secționarea ADN „țintă” s-a făcut de partea 3', decalat la 4, 5, 9 sau 11 pb, ea trebuie să se facă de partea 5' a EGT).

3) Final, se realizează legarea celor patru extremități produse, corelat cu duplicarea elementului transpozat. Din acest proces rezultă un element cointegrat, a cărui disociere la nivelul celor două copii ale transpozonului duce la formarea a doi repliconi, fiecare purtînd un element transpozabil. Fig. 75 prezintă, conform acestui model, transpoziția EGT

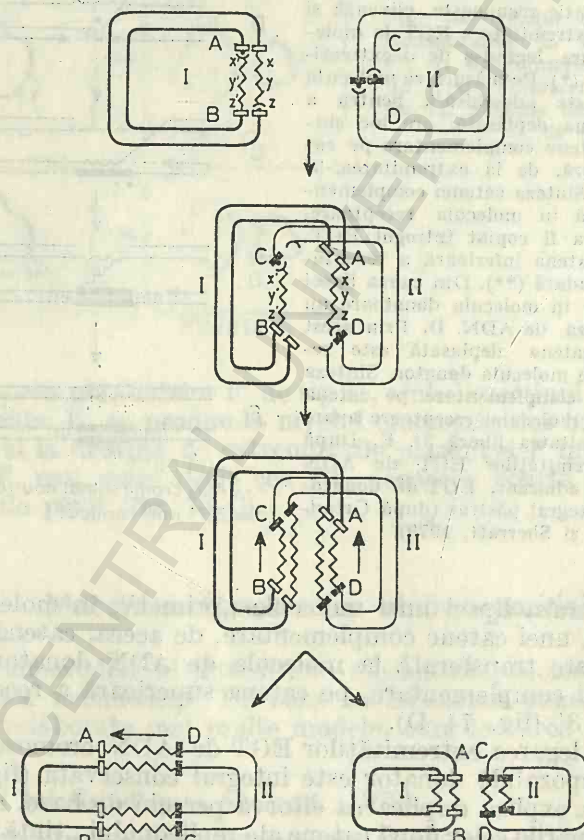


Fig. 75. — Modelul de transpoziție Shapiro, Arthur și Sherratt. Transpoziția elementelor x, y, z de pe repliconul I pe repliconul II. Dreptunghiurile reprezintă cele citeva perechi de baze dedublate în cursul procesului de transpoziție. Extremitățile 3' și 5' sînt reprezentate prin semnele • și U.

xyz, prezent pe repliconul I, pe repliconul II. Modelul are ca o etapă obligatorie a procesului de transpoziție fuziunea repliconilor. El explică totodată apariția delețiilor și a inversiunilor, care ar rezulta din transpoziții intramoleculare, ce nu sînt urmate de disociere.

Este de menționat faptul că modelele lui Shapiro, Arthur și Sherratt explică cele șase tipuri de evenimente distincte care pot urma procesului de transpoziție și anume: 1) transpoziția intramoleculară; 2) fuziunea repliconilor; 3) transpoziția intramoleculară în sens opus, cu inversiune; 4) transpoziția intramoleculară fără inversiune; 5) transpoziția intramoleculară în aceeași orientare; 6) deleția materialului genetic adiacent (fig. 76).

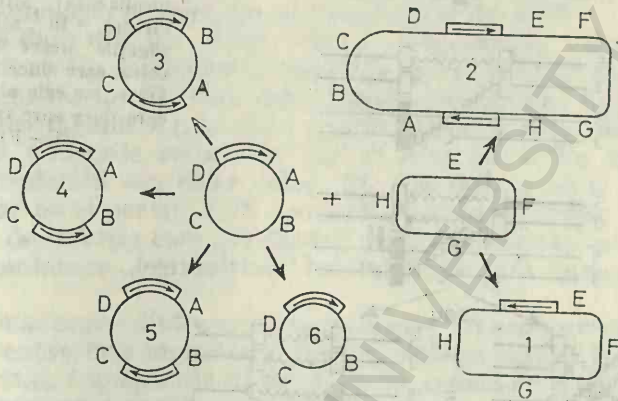


Fig. 76. — Diferitele modificări determinate de transpoziția elementelor genetice transpozabile (EGT). 1. Transpoziție intermoleculară. 2. Fuziune de repliconi. 3. Transpoziție intramoleculară în sens opus, cu inversiune. 4. Transpoziție intramoleculară în sens opus, fără inversiune. 5. Transpoziție intramoleculară, în aceeași orientare. 6. Deleția de material genetic adiacent. EGT este reprezentat printr-un dreptunghi. Săgeata indică polaritatea (după Cornelis, 1982).

Modelul Galas și Chandler

Considerat ca aplicabil tuturor tipurilor de elemente transpozabile, modelul Galas și Chandler (1982) propune următoarea succesiune de faze (fig. 77);

1) Secționarea unei singure catene pe fiecare din cei doi repliconi (fig. 77 A, B) și legarea transpozonului de ADN „țintă” (fig. 77 C).

2) Formarea unei bifurcații de replicare între cele două catene ale transpozonului. Funcția de „primer” este îndeplinită de extremitatea 3', disponibilă a moleculei donator (fig. 77 D).

3) După replicarea completă a transpozonului are loc clivarea celei de-a doua catene a moleculei receptor, într-o poziție decalată față de prima. Molecula donator suferă de asemenea o a doua clivare (la cealaltă extremitate a EGT în raport cu prima clivare). În final (fig. 77 E, F), cele două extremități libere se reunesc. Modelul prevede modalități alternative pentru cea de-a doua secționare a moleculei donator: ea se face pe o catenă care a fost deja clivată și rezultatul procesului este o transpoziție simplă, sau se face pe o alta și rezultatul este fuziunea celor doi repliconi (fig. 77). Structura terminală depinde deci de alegerea catenei care participă la ultima legare.

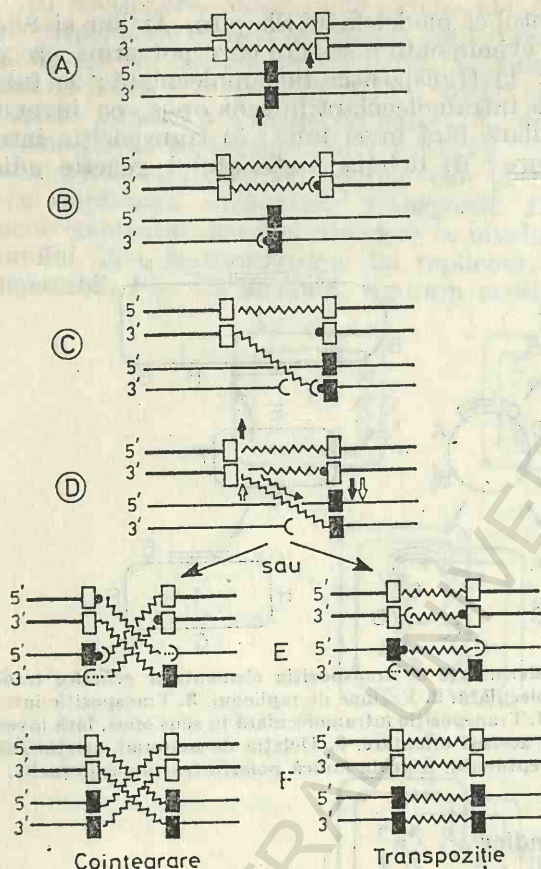


Fig. 77. — Modelul lui Galas și Chandler de producere a transpoziției (A — C) (după Cornelis, 1982). Dreptunghiurile reprezintă cele câteva perechi de baze dedublate în cursul procesului de transpoziție. Extremitățile 5' și 3' sunt reprezentate prin semnele ● și ○. Săgețile verticale localizează situsurile de clivare. În schema D, săgețile negre reprezintă calea care duce la cointegrare, iar cele albe, pe cea care duce spre transpoziție (E—F).

Semnificația biologică generală a elementelor genetice transpozabile

Anterior descoperirii elementelor genetice transpozabile se considera că mutațiile și recombinările genetice omologe („legitime”) reprezentau singurele mecanisme importante capabile să explice producerea diversității biologice. Aceste mecanisme păreau să explice în mod satisfăcător nu numai gradul de diversitate prezent în lumea microorganismelor, ci și constrîngerile recombinărilor omologe (care împiedică schimbul de informație genetică între organisme neînrudite, cărora le lipsește o mare similaritate a secvențelor de ADN), viteza modestă a evoluției biologice, precum și persistența distinctă a diferitelor specii, care își păstrează identitatea de bază de la o generație la alta. Concepția tradițională atribuia cromosomului bacterian rolul unui genom „individual”, prezent sub forma unui ansamblu de gene, purtător de informație genetică esențială, dispuse linear, într-o ordine imuabilă.

Descoperirea plasmidelor a dus la ideea de genom „colectiv”, capabil să determine o evoluție mai rapidă, decurgînd din caracterul lor facultativ

și din capacitatea de a fi transmisibile cu frecvență mare de la o bacterie la alta. Prezența elementelor genetice transpozabile în structura tuturor tipurilor de ADN întâlnite în celula procariotă (cromosom, plasmide, fagi) îi conferă acestora un mecanism suplimentar de modificare a informației genetice, implicând recombinația între regiuni relativ neînrudite ale cromosomului, plasmidelor sau fagilor (Nevers și Saedler, 1977). Aceste procese numite generic *recombinări „nelegitime”* (Campbell, 1962) se realizează prin căi care evită sau ocolește căile convenționale de recombinare bazate pe omologia secvențelor din moleculele de ADN.

După date mai noi (Birge, 1981), recombinația Tn și a fagului Mu se consideră un tip particular de *recombinare la situs specific unic*, deoarece este determinată de SI, care delimitează diferiții Tn. Spre deosebire de recombinația fagului λ („la situs specific dublu”), care necesită omologia limitată la situsurile respective (*gal* și *bio*), cea a Tn necesită doar o omologie moderată sau chiar deloc. Ea s-ar face la situs specific pentru donator, dar nu și pentru ADN receptor (Kornberg, 1980). În felul acesta, secvențele de inserție care flanchează un Tn ar acționa ca situsuri specifice de recombinare „legitimizind” recombinația prin împerecheri omologe minimale.

Cele mai multe dintre evenimentele care urmează procesului de transpoziție au consecințe importante pentru biologia celulei bacteriene. După cum am arătat, transpoziția SI sau a Tn în cadrul unui genom se însoțește de un eveniment deosebit de important pentru evoluție, replicarea și pe această cale duplicarea informației genetice conținută în EGT la fiecare transpoziție: o copie rămâne la situsul original, iar cealaltă este translocată și integrată la un alt situs din genom. Din aceasta apare caracterul „invariant” al EGT.

Inserția elementelor transpozabile poate influența prin ea însăși activitățile celulei bacteriene, putând fi sursa unor perturbări în exprimarea calitativă și cantitativă a genelor. Ea poate crea gene noi prin fuziunea genelor gazdei cu genele elementului genetic transpozat. Elementele transpozabile care poartă situsuri „promotor” pentru inițierea sintezei de ARNm pot acționa, după inserție, ca un „comutator biologic”, capabil să declanșeze sau să blocheze expresia genelor apropiate. În unele cazuri, inserția unei SI într-o anumită orientare „închide” funcțional o genă apropiată, în timp ce inserată în orientarea opusă poate declanșa intrarea în acțiune a genei represate. În felul acesta, EGT au rol nu numai în reorganizarea structurală a genomurilor din celula bacteriană, ci și în exprimarea funcțională a informației genetice din compoziția lor (fig. 78).

Elementele transpozabile furnizează un mecanism prin care cromosomii ar putea deveni mai mari și mai complecși, deoarece măresc potențialul de amplificare genică. Ele conferă celulei bacteriene posibilitatea ca mai degrabă să adauge genomului celular ADN exogen provenit din infecția fagică sau din conjugare decât să înlocuiască materialul genetic omolog.

Capacitatea elementelor transpozabile de a produce rearanjări cromosomale, de a încorpora în structura lor proprie gene derivate din cromosom, de a se insera repetat ele înșile odată cu genele încorporate și de a fi excizate, demonstrează rolul lor ca principal mecanism prin care a evoluat organizarea ADN și deci a celulelor procariote și poate chiar a

celor eucariote. Acest mecanism explică diversitatea structurală și genetică a plasmidelor, ca și anumite tipuri de interacțiuni între ADN cromosomal și extracromosomal. Recombinările „nelegitime” determinate de

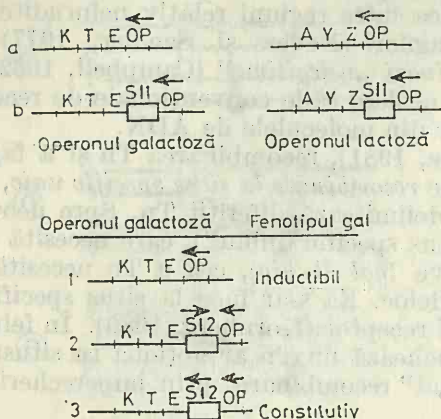


Fig. 78. — Integrarea SI 1 în operonii *gal* și *lac* împiedică transcrierea genelor structurale, K, T, E, respectiv A, Y, Z, deoarece le separă de regiunea operator—promotor, OP (a, b); SI 2 poate fi inserată în operonul *gal* (1) în două orientări. În prima orientare (2), ea reprezintă transcrierea genelor K, T, E. În orientarea doua (3), determină exprimarea constitutivă a genelor respective, deoarece SI 2 funcționează ca promotor în transcrierea genetică (după Nevers și Saedler, 1977).

EGT pot conferi bacteriilor unele avantaje biologice, în special în relațiile lor cu mediul înconjurător atât de schimbător, furnizind în același timp un mecanism potențial de schimb de informație genetică. Ele fac parte din istoria naturală a cromosomului bacterian și a plasmidelor, care reprezintă entități genetice compuse, formate din blocuri distincte de informație genetică legate între ele prin secvențe de inserție. Este probabil că în viitor EGT vor fi evidențiate într-o gamă largă de organisme și odată cu aceasta vor fi întâlnite multe exemple de gene care sunt mobilizate de ele, cu importante avantaje selective. Capacitatea EGT de a lega segmente structural și ancestral deosebite, la bacterii, precum și evidențierea lor la plante și la animale este de o mare importanță pentru producerea diversității genetice și pentru evoluția sistemelor biologice. Este probabil că în cursul evoluției, recombinațiile „nelegitime” mediate de EGT au precedat recombinația genetică generală, deoarece au avut o importanță mult mai mare în formarea genomurilor primordiale, prin asamblarea unor segmente dispartate de ADN. Recombinația genetică bazată pe omologie a apărut mai târziu, odată cu necesitatea producerii unor modificări mult mai rafinate ale genomului (Reanney, 1979). Studiile foarte amănunțite efectuate la *E. coli*, dar extrapolabile și la celelalte specii bacteriene arată că în ciuda existenței unei multitudini de mecanisme naturale, care favorizează schimbul de material genetic fără nici o înrudire, această bacterie a reușit să dobândească și să conserve o stabilitate globală, relativ mare, a structurii sale genetice (Arber, 1979).

Natura și originea elementelor genetice transpozabile

După Campbell (1979), EGT ar putea fi considerate ca segmente de ADN străin, care „parazitează” cromosomii bacterieni și plasmidele. Unele elemente transpozabile, cum sunt fagii λ și Mu, au fost probabil

la origine secvențe de inserție sau transpozoni de tip special, care, ulterior, în cursul evoluției au fost „închise” într-un înveliș proteic, pentru a evolua într-un ciclu viral. Apariția de noi EGA se face probabil prin modificarea celor preexistente, printr-o serie de mecanisme diferite, inclusiv prin încorporarea de gene cromosomale și mai puțin probabil *de novo*. Experimental, utilizând numai mijloace fiziologice naturale pot fi constituite în laborator EGA, care pot conține, teoretic, orice genă a celulei gazdă. Este de conceput deci, că un proces similar ar putea avea loc și în natură (Campbell, 1981).

Deși este foarte probabil că EGT „nu se plimbă după gustul lor” într-un genom (Hélène, 1984), fiind supuse unui control genetic ce determină cel puțin frecvența transpozițiilor, ele rămân o sursă potențială, excepțională de variabilitate. Datorită acestui fapt, Cohen și colab. (1977) le consideră parte integrantă a unui sistem evolutiv elaborat de organisme vii, pentru a acționa ca adevărați agenți ai „macroevoluției” (vezi p. 457).

Elementele genetice transpozabile ca „gene egoiste”

Ford, Doolittle și Sapienza (1980) au emis ideea încadrării elementelor transpozabile prezente la procariote, în categoria genelor „egoiste” („selfish genes”) lipsite de o exprimare fenotipică și a căror unică „funcție” ar fi aceea de „supraviețuire” într-un genom.

Conceptul de „ADN egoist” a fost dezvoltat pornind de la o serie de observații efectuate asupra organismelor superioare. Ohno (1972), Hinegarder (1976), precum și Cavalier-Smith (1978) au emis ipoteza că la organisme superioare, ADN constă dintr-o minoritate de secvențe cu funcții înalt specifice și o majoritate cu specificitate mică sau nulă. Există probe că majoritatea secvențelor ADN de la cele mai multe organisme superioare nu codifică proteine și, ca urmare, nu se regăsesc în secvențe de ARNm. O parte din aceste secvențe au rol în reglare, dar cea mai mare parte nu au funcții cunoscute pînă în prezent.

Încercînd să definească limitele noțiunii de „ADN egoist”, Crick (1979), unul dintre promotorii acestei idei, precum și Orgel și Crick (1980), consideră că acesta are două particularități esențiale: 1) se formează cînd o secvență de ADN se răspîndește producînd copii adiționale ale propriei sale structuri în genom și 2) este lipsit de orice funcție sau are numai o funcție neînsemnată și, ca urmare, nu aduce nici o contribuție specifică la fenotipul organismului-gazdă.

Orgel și Crick (1980) au încercat să arate modul diferit de cel normal în care evoluează secvențele de ADN „egoist”. Astfel, teoria selecției naturale furnizează o explicație plauzibilă sub raportul geneticii moleculare, a răspîndirii genelor „utile” sau a secvențelor de ADN, în cadrul competiției dintre organisme. Organismul care poartă o genă ce contribuie pozitiv la adaptarea („fitness”) sa tinde să-și crească numărul reprezentanților în mediu în dauna organismelor care nu posedă acea genă utilă, astfel încît cu timpul vor supraviețui numai organismele posesoare ale genei „utile”. În acest context și conform teoriei selecției naturale, un organism care poartă mai multe copii ale unei anumite secvențe utile de ADN este mai adaptat („fitter”) decît unul care poartă o singură copie. Dacă

există mecanismele necesare pentru multiplicarea secvenței respective, atunci selecția naturală va duce în mod inevitabil la apariția unei populații în care secvența respectivă va fi reprezentată de mai multe ori în fiecare genom (Orgel și Crick, 1980).

Situația ADN „egoist” este fundamental diferită. Neavind nici o contribuție în exprimarea fenotipică a organismului-gazdă și neputînd fi transcris (în cea mai mare parte la ARNm), răspîndirea sa în genom poate fi comparată cu răspîndirea unui parazit, nu prea dăunător pentru gazdă. Selecția naturală între genotipuri furnizează o forță care încearcă să mențină cantitatea totală de ADN „egoist” la o stare de echilibru „(steady state)”. Organismele posesoare ale unei proporții excesive de ADN „egoist” prezintă un dezavantaj metabolic față de cele cu mai puțin ADN „egoist” și ar fi eliminate prin mecanismul normal al selecției naturale. Răspîndirea secvențelor ADN fără funcție ar putea fi considerată ca un „cancer” al genomului, deoarece expansiunea necontrolată a unui segment genomic duce în final la extincția genotipului care permite o astfel de expansiune (Orgel și Crick, 1980).

Doolittle și Sapienza (1980) consideră că elementele genetice transpozabile ale bacteriilor, ca și secvențele respective descrise la eucariote se încadrează în acest concept, deoarece multe EGT sînt lipsite de expresie fenotipică și se comportă cu un caracter invadant, ca și cum unica lor funcție ar fi aceea de a supraviețui în genom. Alți autori (Cohen, 1976, 1979) Johnsrod (1979) ș.a. scot în evidență rolul elementelor transpozabile în geneza rearanjărilor cromosomale, în evoluția cromosomului și a plasmidelor și în general în evoluția unei adaptări („fitness”) fenotipice de lungă durată. Unii autori cred chiar că selecția naturală a modelat aceste secvențe nucleotidice neobișnuite exact pentru aceste scopuri. După Doolittle și Sapienza (1980), deși elementele transpozabile pot fi benefical implicate în evoluția procariotelor, există motive de îndoială privind ideea că ele au apărut și sînt menținute de presiunea selecției pentru astfel de funcții evolutive. În primul rînd, pentru faptul că EGT nu aduc nici un beneficiu fenotipic imediat și nici un avantaj selectiv pentru posesorul lor. Ceva mai mult, excesul de ADN reprezintă cheltuială energetică inițială, iar unele activități ale EGT sînt chiar net distructive (Cohen, 1976; Nevers și Saedler, 1977). În plus, evoluția nu este niciodată anticipatorie: o structură nu apare niciodată și nu evoluează pentru ca să fie utilă în viitor. Avantajele selective furnizate de adaptabilitate sînt prea îndepărtate pentru a asigura formarea și menținerea secvențelor respective și a „mașinării” enzimactice implicate în sinteza, menținerea și transpoziția lor. Aceasta explică de ce chiar EGT lipsite de o expresie fenotipică demonstrată, au elaborat o strategie — capacitatea de transpoziție — care asigură însăși „supraviețuirea” lor în genotipurile bacteriene.

Rolul EGT la eucariote. Deși EGT au fost evidențiate la un număr foarte limitat de organisme eucariote sînt de menționat cel puțin două aspecte legate de problemele microbiologiei generale: 1) asocierile variabile ale unor fragmente de gene în genomul limfocitelor ar putea explica originea mării diversități a anticorpilor și 2) „mobilitatea” anumitor determinanți genetici permite unor paraziți să evite reacțiile de apărare ale organismului-gazdă. Un exemplu tipic este reprezentat de tripanosome,

care sînt acoperite la suprafață de un adevărat „covor” de molecule de glicoproteine, față de care organismul-gazdă fabrică anticorpi protectori. Tripanosomele au o rezervă de ~ 100 de gene, situate într-o regiune inactivă a genomului lor, fiecare avînd capacitatea de a codifica sinteza unei glicoproteine diferite. Perioadic, o copie a diferitelor gene este inserată prin transpoziție în regiunea activă, unde este transcrisă și tradusă, asigurînd formarea unor noi glicoproteine de suprafață. Odată cu aceasta, parazitul schimbă „mantaua” glicoproteică sensibilă la prezența anticorpilor, cu una nouă. Acest proces se repetă la fiecare ciclu, prin punerea în funcțiune a altor gene din rezervă, fapt care asigură persistența infecției. Ca urmare, organismul-gazdă nu se poate apăra, deoarece la fiecare ciclu se formează un nou înveliș glicoproteic și dispare cel vechi, față de care organismul „știe” să se apere (Hélène, 1984).

Hărțile genetice ale bacteriilor

Redarea într-o reprezentare grafică atât a poziției, ordinii și înălțurii genelor bacteriene, cât și a distanțelor relative care le separă reprezintă hărțile genetice bacteriene. Ele se constituie într-o sinteză a cunoștințelor asupra organizării genetice a unei specii, dînd o serie de informații privind : 1) structura circulară sau lineară a unui genom ; 2) poziția genelor cunoscute ; 3) spațiile „albe” în care funcțiile genetice sînt încă neidentificate și 4) permit identificarea genelor cartate în funcție de localizarea pe un anumit cromosom și furnizează informații prețioase privind natura și poziția mutațiilor independente. Poziția genelor în genomul bacterian poate fi stabilită atât printr-o serie de tehnici pur genetice, cât și prin tehnici fizice și chimice, chiar cu mai mare acuratețe.

Tehnicile genetice de cartare. Principii generale. Deoarece bacteriile și bacteriofagii sînt haploide și au un singur cromosom, tehnicile genetice, în general, se bazează pe introducerea în aceeași celulă a două alele distincte ale aceleiași gene (deosebite prin anumite caractere marcante), și pe analiza prezenței lor la descendenți (Pettijohn și Carlson, 1979). Acest studiu a devenit posibil prin aplicarea ingenioasă în cartarea genetică a tehnicilor experimentale ce permit obținerea unei astfel de diploidii. După ce cele două molecule de ADN (care poartă alelele respective) au ajuns în aceeași celulă ele pot interacționa prin recombinare, pentru a forma noi molecule de ADN, care conțin părți din ambele molecule parentale. Recombinarea legitimă („normală”) necesită omologie extensivă între secvențele de baze ale celor două molecule parentale. Recombinările se pot produce aparent cu probabilitate egală (cel puțin la prima aproximație), în orice poziție a moleculei de ADN. Din cauza naturii sale aproape aleatorii, acest proces poate fi folosit pentru a furniza informații despre poziția genelor.

Experimental s-a demonstrat că dacă două molecule parentale conțin mutații în gene diferite, probabilitatea ca molecula-fiică (rezultată din recombinare) să conțină ambele mutații sau nici una este în funcție de cantitatea de ADN dintre genele afectate. În cazul unei molecule de ADN cu secvența de gene *ABCDEFGH*, șansa de recombinare între doi loci * va crește pe măsură ce distanța dintre ei crește. Ca urmare, numărul

* Termenul *locus* (pl. *loci*) este folosit cu mai multe accepții în genetica bacteriană. El este potrivit pentru a indica o poziție fizică pe cromosom. Dacă se spune, spre exemplu, că doi markeri sînt cartai în același locus, aceasta arată că ocupă poziții similare. În sens foarte general, denumirea de locus poate desemna o anumită regiune cromosomală sau, mai specific, mici sectoare din cromosom.

recombinărilor între locii D și G va fi mai mare decât între D și E sau între F și G.

Frecvențele de recombinare între perechi de gene observate la descendenții bacteriei sau fagului pot fi utilizate ca indicatori ai distanței relative dintre genele respective în genom. În cazul în care numărul frecvențelor de recombinare este suficient de mare, se poate stabili și ordinea genelor în cromosom.

Procentul de recombinări este folosit ca număr de unități („recombinational map units”) pe harta genetică de recombinare. Astfel, dacă doi loci produc 10% tipuri recombinante se poate aprecia că aceștia se găsesc la o distanță de 10 unități de recombinare. Experimental s-a demonstrat că în cazul în care doi loci produc un număr egal de tipuri parentale și recombinante printre progeni (adică se găsesc la distanța de 50 de unități pe harta de recombinare) („recombination linkage map”), se poate considera că recombinarea lor a avut loc independent unul de altul, adică aleatoriu, deoarece nu a fost limitată de distanța dintre ei (Pettijohn și Carlson, 1979). Studiile efectuate pe fagii T-par au arătat că, deși numărul genelor este > 100 , numărul evenimentelor de rupere și reunire care duc la recombinări este mult mai mic, fiecare genă având tendința de a-și menține vecinii din stînga și din dreapta. Lucrurile se petrec ca și cum înlănțuirea genelor („linkage”) ar reprezenta o rezistență care trebuie învinsă de procesul de recombinare.

Nomenclatură. Fiecare locus este marcat pe harta genetică și identificat printr-un simbol de 3 litere, urmat de multe ori de o literă majusculă, pentru a deosebi cistronii individuali, secvențele operator sau promotor. Spre exemplu, *dap A*, pentru diaminopimelat sintetaza, *gal K*, galactokinaza, *lys C*, lizin aspartokinaza ș.a.m.d.

Utilizarea conjugării în cartarea genetică. Jacob și Wollman (1956, 1961) au imaginat o tehnică de determinare a secvenței genelor în cromosom, prin întreruperea deliberată a conjugării $Hfr \times F^-$, la intervale fixe de timp, înregistrînd intervalul de timp necesar pentru apariția unui anumit caracter marcant în celula receptor.

Tehnica se bazează pe următoarele fapte demonstrate experimental: 1) disocierea rapidă a cuplurilor de conjugare prin agitare în mixer nu influențează viabilitatea exconjuganților și nici capacitatea de recombinare genetică sau de manifestare a genelor transferate în recombinanți; 2) transferul cromosomului *Hfr* are loc unidirecțional, cu o viteză constantă (10^5 b/minut), în așa fel încît intervalul de timp dintre trecerea în celula receptoare a doi „markeri” genetici reprezintă o măsură a distanței dintre genele corespunzătoare pe cromosomul donatorului. Pe baza acestei relații se poate trasa o hartă genetică reprezentînd ordinea în care diferiți markeri genetici sînt situați pe cromosomul bacteriei donatoare *Hfr*, precum și distanțele dintre ei. Lungimea acestor distanțe este direct proporțională cu timpul necesar pentru pătrunderea fiecărei gene în celula receptoare. O asemenea reprezentare ar putea fi asemănată cu o „hartă feroviară”, în care distanța dintre două stații ar corespunde unei gene, dar în care această distanță ar fi măsurată nu în unități de lungime, ci în funcție de timpul necesar unui tren care circulă cu viteză constantă, pentru a ajunge de la o stație la alta. Lungimea diferită a genelor, repre-

zentate pe hartă, sugerează o diversitate corespunzătoare a dimensiunii produsilor sintetizați sub controlul lor. Durata de transfer a cromosomului integral este de 100 minute. Transferul începe la un situs unic din structura plasmidei F integrate, continuă cu toate genele cromosomale (dacă conjugarea nu este întreruptă spontan sau deliberat) și se încheie cu restul plasmidei F, care nu a fost transferată inițial. Transferul primei gene ar avea loc după 8 minute, după Strickberger (1976) și numai după 5 minute, după Taylor și Thoman. ADN transferat se recombina cu cel existent în bacteria-receptoare și dacă cele două molecule provenite de la bacteriile ♂ și ♀ au markeri genetici adecvați, prezența acestora poate fi urmărită la celulele progene rezultate după conjugare. Determinind durata procesului de conjugare necesară pentru apariția acestor recombinanți și comparind aceste date cu cele referitoare la alți markeri genetici se poate stabili poziția lor relativă de-a lungul cromosomului bacterian. Au fost izolate mai multe tulpini Hfr diferite, care conțin factorul F integrat în situsuri variate de-a lungul cromosomului bacterian. Faptul că toate aceste tulpini sînt capabile să transfere prin conjugare întregul cromosom bacterian pledează pentru structura sa circulară. De aceea, deși transferul cromosomului Hfr se realizează linear, prin „deschiderea” lui în diferite situsuri, harta genetică este reprezentată circular. Transferul unui cromosom Hfr cu secvența de gene A B C ... Z se poate face fie în ordinea A → Z, fie Z → A, în funcție de orientarea în care s-a integrat plasmida F, care determină polaritatea transferului. Deși tehnica conjugării întrerupte furnizează date mai aproximative, ea este mai ușor de efectuat. Exprimind relația dintre gene și poziția lor pe cromosom în unități de timp, ea nu implică necesitatea de a calcula frecvența de recombinare, simpla apariție mai precoce sau mai tardivă, în raport cu altele, fiind suficientă pentru a indica locul pe cromosom.

Cartarea bazată pe frecvența de recombinare. O altă tehnică de elaborare a hărților genetice se bazează pe calculul frecvenței de recombinare în procesele de conjugare neîntreruptă. Ea se bazează pe observația că ordinea de succesiune a genelor pe cromosom poate fi stabilită nu numai prin determinarea momentului pătrunderii lor în celula receptoare, ci și prin frecvența recombinării lor cu cromosomul acesteia.

Probabilitatea de transfer și recombinare descrește exponențial cu distanța de la punctul de origine a transferului, ceea ce sugerează o probabilitate constantă de rupere pe unitate de lungime cromosomală. Astfel, markerul A care pătrunde primul în bacteria F⁻, fiind cel mai apropiat de „originea” transferului, are o frecvență de recombinare de 40% (40% din cupluri de conjugare produc recombinanți pentru A). Markerul B, mai îndepărtat de „originea”, care intră după 20 minute, are 10%, C, care pătrunde după 30 minute, are 2%, iar ultimul marker, la sfîrșitul transferului, are frecvența de recombinare de 0,05%. S-a demonstrat că diverșii markeri de pe cromosom nu pot fi separați în vederea recombinării, decît dacă între ei este posibil un crossingover și că, pe de altă parte, unii dintre ei au o tendință foarte marcată de a rămîne legați împreună în cursul recombinării. În general, cu cît doi markeri sînt mai apropiați ca localizare pe cromosom, cu atît există mai puține șanse ca între ei să se producă un crossingover care să îi separe și cu atît este mai mare posibilitatea ca

ei să fie transmiși împreună. Demonstrarea posibilității ca mai mulți markeri să rămână legați între ei a permis stabilirea poziției lor pe cromosom.

Raportul dintre lungimea fizică și lungimile unităților de hartă. Inițial, s-a apreciat că lungimea fizică a ADN, echivalentă cu un minut pe harta genetică, este de 41 kb. Această valoare a fost dedusă în raport cu lungimea cunoscută a plasmidei F (94,5 kb). Davidson (1980) a propus o corecție, în funcție de care această valoare este de 38–39 kb/min. În sfârșit, analiza electronografică a ADN arată că distanța dintre genele *lac* și *gal* ($412,9 \times 1,03$ kb) corespunde la o lungime de 8,8 minute pe harta genetică, respectiv de 48 kb/min (Ohtsubo și Hsu, 1978). Aceste date demonstrează relativă incertitudine în legătură cu lungimea absolută a diferitelor unități pe harta genetică (Bachmann și Brooks-Low, 1980).

Cartarea prin transducție fagică. Transducția fagică reprezintă o modalitate utilă de cartare a unor segmente mici cromosomale, care pot fi încorporate și transferate în celula receptoare. Se folosește în special fagi de transducție generalizată, ca fagul P1, la care unele particule progene pot să conțină segmente de ADN bacterian, secționare la întâmplare, având dimensiunea genomului viral (64×10^6 dal sau 97 kb). Deși obișnuit este transdus un singur marker genetic, există cazuri când se transferă simultan doi sau mai mulți markeri (*transducție linkată* sau *cotransducție*).

Frecvența relativă a transducției multiple poate fi folosită pentru a constitui succesiunea genelor în segmente scurte de ADN. S-a stabilit că frecvența cu care două gene pot fi cotransduse (adică pot fi conținute în aceeași particulă fagică) este corelată invers cu distanța dintre gene. În cazul fagului P1, doi markeri nu pot fi cotransduși decât dacă sînt separați de o distanță mai mică decât lungimea genomului fagie (97 kb), care corespunde în conjugare unui segment transferat în ~ 2,3 min. Prin combinarea hărților scurte de linkaj care au gene în comun se pot construi hărți genetice ce reunesc secvențele tuturor genelor cunoscute.

Cartarea prin transformare genetică. Determinarea frecvenței cu care doi markeri genetici apar la descendenții unei bacterii expuse transformării genetice oferă posibilitatea deducerii poziției relative a celor două gene în cromosomul celulei donatoare.

Experimental este demonstrat că în cazul a două gene, *A* și *B*, îndepărtate pe cromosom, probabilitatea de a fi incluse în același fragment de ADN transformant este foarte mică. În acest caz, transformarea dublă a bacteriei receptoare (pentru ambele gene) este rezultatul transferului a două segmente de ADN, dintre care unul poartă gena *A* și altul gena *B*. Dacă însă genele *A* și *B* sînt situate foarte apropiat pe cromosom, dubla transformare poate rezulta fie prin transferul a două fragmente separate, fie al unui fragment care include ambele gene. Pentru a determina mecanismul transformării se stabilește inițial frecvența caracteristică a transformării pentru un marker individual la specia respectivă și apoi, frecvența de transformare a celor două gene. Dacă cele două gene, *A* și *B*, nu sînt asociate pe fragmentul de ADN, dubla transformare va fi făcută de segmente separate și va fi realizată cu o probabilitate egală cu produsul frecvențelor individuale. Acesta va fi reprezentat de un număr mult mai

mic decât cel al fiecărei frecvențe individuale în parte (spre exemplu, pentru markerii de streptomycinorezistență și fermentația manitolului frecvența este de $\sim 0,006\%$). Dacă însă numărul celulelor dublu transformate este mult mai mare (în practică $\sim 0,1\%$, respectiv de 17 ori mai mare), apropiindu-se de frecvența unei transformări individuale, se poate trage concluzia că cele două gene sînt foarte apropiate și au participat la un eveniment unic de transformare genetică. Deci, cei doi markeri, foarte apropiați pe cromosomul bacterian, sînt localizați pe același segment de ADN transformant.

Presupunind existența unui segment de ADN cu g.m. 5×10^6 dal și markerii X Y, Z, putem stabili, spre exemplu, că gena X este legată de Y și Y de Z. În acest caz, este ușor de dedus ordinea X Y Z a markerilor respectivi de-a lungul cromosomului. Utilizînd frecvența transformărilor duble, care este mai mare pe măsură ce markerii sînt mai apropiați, putem construi hărți de linkaj pentru diferite segmente ale cromosomului bacterian. Asociînd aceste date cu informațiile provenite de la alte evenimente de transformare genetică, segmentele respective pot fi dispuse într-o ordine secvențială pe harta întregului cromosom, adesea cu posibilitatea aprecierii distanțelor relative intergenice.

Cartarea prin deleție. Utilizarea mutantelor cu deleții de diferite lungimi reprezintă un mijloc deosebit de eficient pentru cartarea genelor strîns apropiate în structura ADN. S-a demonstrat că recombinarea între mutantele cu deleții are loc numai dacă mutațiile punctiforme care apar asociat sînt localizate în afara regiunii eliminate prin deleție (fig. 79).

Localizările mutațiilor punctiforme

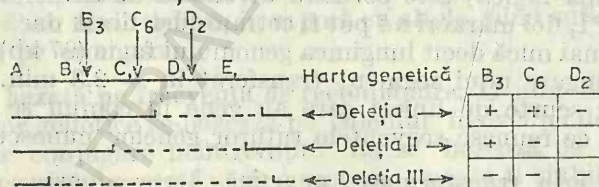


Fig. 79. — Rezultatul recombinărilor între mutante punctiforme cu deleții în diferite localizări. Sînt prezentate harta genetică și localizările mutațiilor, precum și rezultatele recombinărilor «+» = prezența recombinării; «-» = absența recombinării; --- = regiuni eliminate prin deleție. Dacă mutația punctiformă se produce într-o regiune cu deleție, recombinația nu poate avea loc (după Brock, 1974).

În cazul în care dispunem de o serie de deleții cu extindere cunoscută, noile mutante punctiforme înregistrate pot fi cartate prin simpla determinare a capacității lor de recombinare cu mutantele prin deleție. Acest tip de cartare nu necesită analize cantitative precise a secvenței de recombinare, deoarece se bazează exclusiv pe determinarea prezenței sau absenței recombinării.

Metodele fizice și chimice de cartare cromosomală

Tehnicile genetice de cartare sînt foarte utile pentru determinarea ordinei relative a genelor. Ele sînt însă mai puțin adecvate pentru a de-

termina lungimea ADN conținut într-o genă sau distanța fizică absolută dintre gene. De asemenea, nu sînt utile în cartarea unor gene cum sînt cele care codifică proteinele ribosomale ale căror mutații sînt greu de depistat.

Folosite asociat cu tehnicile genetice, metodele fizice și chimice pot suplini multe din aceste inconveniente. Microscopia electronică a permis evidențierea directă a ADN, după „acoperirea” și „îngroșarea” lui pentru a-l face vizibil, cu o proteină bazică de tipul citocromului *c*. Au devenit astfel posibile măsurătorile de lungime cu erori de ± 50 pb, observarea ADN m.c. prin tehnica heteroduplexelor, compararea regiunilor de omologie și lipsă de omologie cu proprietățile genetice ale ADN parental și determinarea poziției fizice a genelor, cartarea moleculelor de ARNm, ARNt și ARNr, prin renaturare cu regiuni m.c. de ADN, detectarea neomogenităților în compoziția de baze de-a lungul ADN d.c. (regiunile bogate în A—T sînt mai puțin stabile și se denaturează mai repede decît cele bogate în G—C, formînd bucle m.c.).

Secvențializarea ADN. Utilizînd principii diferite, Sanger și Coulson (1975, 1977), precum și Maxam și Gilbert (1977, 1980) au pus la punct tehnici de secvențializare a ADN, respectiv de stabilire a ordinii bazelor nucleotidice de-a lungul acestuia. Numărul pb variază între 5 375 baze la fagul $\Phi X174$ și 240 000 000 pb, în cazul celui mai mare cromosom uman. De aceea, este necesar ca în prealabil să se fragmenteze molecula în segmente cu dimensiuni adecvate și să se purifice fiecare tip de fragment.

Obișnuit, se recurge la clonarea acestor segmente într-o plasmidă sau într-un fag ca vector. După introducerea lor într-o bacterie-gazdă și amplificarea moleculei de ADN hibrid rezultată, segmentele de ADN clonate pot fi eliberate pentru secvențializare, prin clivare cu o endonuclează de restricție (Volkaert și colab., 1984). Determinarea secvenței ADN permite o rezoluție maximă a cartării, asigurînd localizarea genelor la nivel de nucleotide și compararea secvențelor cu aceea a produsului lor proteic. Ea a stat la baza unei descoperiri importante ca aceea a genelor „suprapuse”. S-a putut demonstra că g.m. a celor 9 proteine codificate de genomul $\Phi X174$ (5 375 baze) depășește capacitatea de codificare a acestuia și s-a putut evidenția că aceeași secvență este citită în două cadre de citire, permițînd sinteza a două proteine (Barrell și colab., 1976; Smith și colab., 1977).

Hărțile genetice de clivare. Inițial, tehnicile fizice și chimice de studiu al ADN erau handicapate de incapacitatea de a obține segmente de ADN cu dimensiuni precise, avînd lungimi care pot fi analizate, în cantitatea și la puritatea necesară.

Utilizarea enzimelor de restricție pentru clivarea ADN a revoluționat tehnica de cartare genetică, deși pînă în prezent acestea au fost folosite numai pentru studiul genomurilor virale și mitocondriale. Tehnica se bazează în principiu pe clivarea ADN la situs specific, fie decalat („staggered”), fie în poziții opuse ($\frac{1}{2}$), cu formarea unor segmente de ADN care pot fi identificate individual și plasate în ordine secvențială. Numărul fragmentelor, raportat la un genom dat, este în funcție de mărimea situsului de recunoaștere. Situsurile tetranucleotidice apar în molecula de ADN odată la 256 baze (4^4), iar cele hexanucleotidice odată la 4 096 baze

(4⁶). Raportat la genomul fagului λ (46 500 baze), în primul caz, se produc ~ 180 de fragmente, iar în cel de-al doilea ~ 12 fragmente. În cazul virusului SV40, care ilustrează principiul metodei, inițial genomul circular (fig. 80) este clivat într-o moleculă lineară cu ajutorul restrictazei EcoR1,

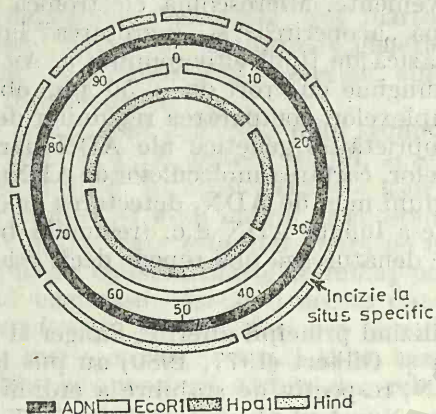


Fig. 80. — Siturile de acțiune ale enzimelor de restricție Eco R1, Hpa 1 și Hind pe genomul SV40 (după Watson, 1977).

care recunoaște secvența GAATTC CTTAAG. Ulterior, alte restrictaze recunosc secvențe care apar mai frecvent în ADN SV40 și formează un număr mai mare de fragmente diferite, mai mici: Hpa-1 produce trei fragmente, iar Hind, 10. Relația dintre diferitele fragmente care pot fi separate prin electroforeză în gel de agaroză se stabilește prin determinarea fragmentelor conținute în segmentele mai mari. Luând cazul unui genom circular, cu secvența ADCB și presupunând că o enzimă de restricție îl clivează la o structură lineară cu secvența ADCB, celelalte enzime formează segmentele ACD, BCD, AD, BC și CD. După cum demonstrează Strickberger (1976), singura ordine lineară care poate explica efectiv secvența ADCB a acestor segmente este cea descrisă prin simpla lor aranjare, în așa fel încât fragmentele similare să se suprapună:

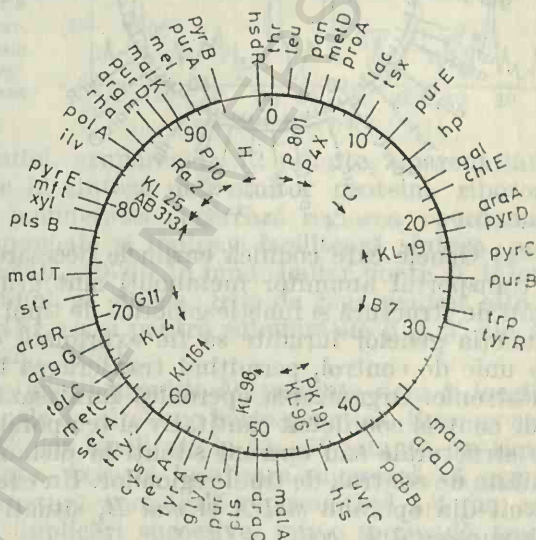
Segmentul	4	Ordinea în segment:	A—D
"	2		A—D—C
"	6		D—C
"	3		D—C—B
"	5		C—B
"	1		A—D—C—B

Fragmentele de restricție pot fi cartate pe un genom printr-o varietate de tehnici ca: hibridarea lor cu ARN specific sau cu alte fragmente, produse prin clivarea aceleiași molecule de ADN cu alte restrictaze, prin cartarea heteroduplexului, prin capacitatea de a lega proteine specifice etc. De asemenea, ele pot fi utilizate în sisteme de transcriere—traducere *in vitro* pentru a identifica produșii proteici pe care îi codifică.

Harta genetică a *E. coli* K 12

Ca și sub alte aspecte, *E. coli* K12 este bacteria cel mai mult studiată sub raportul organizării genetice. Harta sa genetică, ajunsă la ediția a 7-a (1984), are forma unui cerc continuu, neramificat, divizat în 100 minute, corespunzând timpului necesar pentru transferul complet al cromosomului prin conjugare. Ea prezintă localizarea a ~ 1 200 gene, cartate cu oarecare precizie, utilizând peste 10 tehnici de studiu. Datorită numărului mare de gene cu poziții stabilite, reprezentarea sa grafică este în ultimele două ediții lineară, hărțile circulare fiind rezervate pentru prezentarea unor variante cu un număr limitat și selectiv de markeri (fig. 81).

Fig. 81. — Harta genetică simplificată a *E. coli* K12. Numerele mari indică poziții pe hartă marcate în minute în raport cu locusul *thr* și amplasarea a 52 de markeri. Originea replicării este situată la 83 minute, iar punctul terminus la 32 minute.



Scala de timp începe convențional cu punctul zero (locusul *thr*), iar minutul 100 corespunde cistronului *cat*, care codifică toleranța la colicina E_2 . Minutul 83 corespunde originii replicării cromosomului (*ori C*), iar minutul 32 (*ter C*) corespunde punctului terminus al replicării bidirecționale.

Harta genetică de la *Salmonella typhimurium* (fig. 82) este, de asemenea, calibrată în 100 de unități convenționale, deși durata transferului prin conjugare este de 138 minute în încrucișările $Hfr \times F^-$. Această opțiune a fost determinată de două cauze: 1) deoarece cele mai multe gene au fost localizate numai aproximativ prin conjugare și mult mai precis prin transducție, „minutul” și-a pierdut din importanță ca unitate de măsură a localizării pe hartă; 2) diferența în timpul de transfer dintre *S. typhimurium* (138 min.) și *E. coli* K12 (100 min.) este datorată, probabil, mai degrabă unei diferențe în viteza transferului, decât în lungimea fizică a cromosomului (Sanderson și Hartman, 1978).

Distribuția genelor de-a lungul cromosomului la *E. coli* K12 are câteva particularități observate și la alte bacterii, unele dintre ele putînd avea caracter de universalitate la procariote :

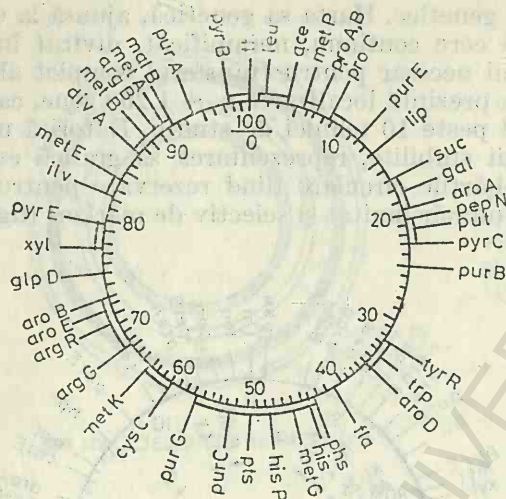


Fig. 82. — Harta genetică circulară de la *Salmonella typhimurium*, divizată în 100 de unități, corespunzând lungimii de 138 minute. Liniiile duble indică seturi de gene care se transmit în bloc prin transducție cu fagii P 1, P 22, KB 1 (după Sanderson și Hartman, 1980).

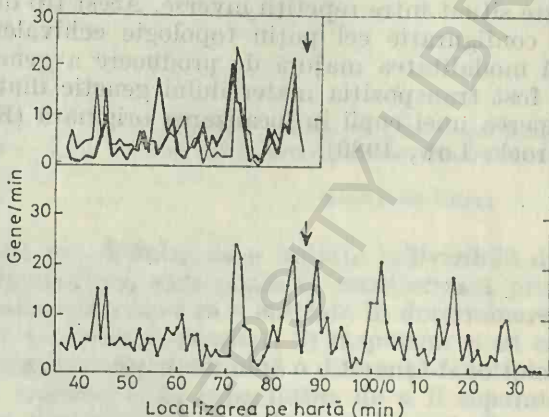
1) Genele care codifică enzimele necesare pentru sinteza, utilizarea sau transportul anumitor metaboliți sînt grupate pe harta genetică în unități de structură și funcție genetică de tipul operonilor. Aceasta permite ca funcția genelor înrudite să fie exprimată coordonat și reglată de un situs unic de control, permițînd transcrierea lor ca o entitate la ARNm policistronic. Organizarea operonică furnizează un mecanism relativ simplu de control coordonat cantitativ și temporal. În unele cazuri, mai multe gene structurale sau operoni situați la distanță pe cromosom pot forma o unitate de control, de tipul regionilor. Un exemplu este regionul maltozei alcătuit din operonii *mal A* și *mal B*, situați la 75, respectiv 91 minute pe cromosomul *E. coli*.

2) Secvențele de inserție (SI) reprezintă un constituent normal al cromosomului *E. coli* K12, dar numărul și natura lor nu sînt încă exact cunoscute. După Southern (1975) și Nyman și colab. (1981) au fost identificate pînă în prezent 6–10 SI 1, 5 SI 2, 5 SI 3 și 1 SI 4.

3) Distribuția genelor cunoscute pe harta genetică nu este întîmplătoare, ci mai degrabă caracterizată prin formarea de grupuri în anumite localizări (fig. 83). Aranjarea lor sugerează o anumită simetrie în jurul unui punct foarte apropiat de originea replicării cromosomului. Punctul terminus al replicării este localizat la $\sim 180^\circ$ distanță de originea replicării, într-o regiune lungă, în care nu se găsesc gene cunoscute (Bachmann și colab., 1976, 1980). În sfîrșit, genele care codifică „mașinăria” de sinteză macromoleculară sînt dispuse în special la 17 minute, de fiecare parte a originii replicării. Semnificația acestei așezări nu este încă clară. Întrucît datorită particularităților replicării cromosomale, genele din această regiune sînt prezente în mai multe copii per celulă, această localizare ar fi avantajoasă deoarece permite o creștere mai rapidă a celulei și eventual o mai mare rezistență la mutații.

4) Unele procese esențiale pentru viața bacteriilor care au ales ca strategie de supraviețuire în natură viteza de replicare și de creștere par să fie, de asemenea, reglate coordonat după cum o sugerează gruparea

Fig. 83. — Distribuția genelor cunoscute pe harta genetică a *E. coli*. Graficul prezintă numărul total de gene cartate în fiecare interval de un minut de lungime a hărții față de localizarea pe harta genetică, începând de la 35 minute și continuând în sensul acelor unui ceasoric. Săgeata situată la 87 minute indică axul de simetrie al grupurilor de gene pe cromosom. În chenar: linia groasă reprezintă numărul de gene pe minut în segmentul de hartă 36–86 minute, dispuse în sens orar, de la stînga la dreapta, iar linia subțire, numărul de gene în segmentul 37–87 minute, în sens antiorar.



genelor care le codifică. Astfel, gruparea la 72 minute, aparent într-un operon, a genelor implicate în sinteza mai multor proteine ribosomale și a subunității α a ARN polimerazei sugerează reglarea coordonată a ARNm și a proteinelor ribosomale și indirect facilitează sinteza proteinelor în general (Fiandt și colab., 1976). În mod similar poate fi interpretată prezența (la 89 min.), unui al doilea grup de gene pentru alte proteine ribosomale, pentru ARNr, ca și pentru subunitățile β și β' ale ARN polimerazei (Lindahl și colab., 1977).

5) Frequent, genele cu funcții înrudite au tendința de a fi localizate la distanță de $\sim 90-180^\circ$ unele de altele pe harta genetică. Spre exemplu, genele *pur G*, *pur I* și *pur C* sînt localizate la 53–55 minute, în timp ce gena *pur B* este la 25 minute. Această localizare sugerează că genomul actual a evoluat dintr-o structură ancestrală reprezentînd 1/4 din mărimea sa actuală, prin două duplicări succesive, într-o perioadă trecută, nedefinită (Pettijohn și Carlson, 1979).

6) *Genele repetate la E. coli*. În ultimii ani, numeroase probe au evidențiat prezența unor duplicări sau evasiduplicări pe cromosomul *E. coli*.

Un prim exemplu este cel al genelor ai căror produși au funcții metabolice importante. Astfel, au fost descrise două gene pentru ARN^{t^{Tr}} (*tyr T* și *tyr U*), localizate la mare distanță una de alta, respectiv la 27 minute și 89 minute. O altă genă evident duplicată este *arg I* și *arg F*, care codifică monomerii aceleiași enzime trimere, ornitin-carbamoiltransferaza, situate la 96 și respectiv la 6 minute și în care secvența bazelor diferă numai cu $\sim 5\%$. Enzima trimeră constă din diferite combinații între monomerii produși de cele două gene. Trimerii puri, codificați separat de una din cele două gene au aceeași activitate enzimatică, dar diferă semnificativ ca stabilitate termică. Deoarece gena *arg F* nu se găsește la alte tulpini de *E. coli* (B, W etc.) se presupune că ea a apărut recent la *E. coli K12* prin duplicarea genei *arg I* (Kikuchi și Gorini, 1976).

Un al doilea exemplu este reprezentat de faptul că microscopia electronică a evidențiat, pe lângă secvențele de inserție identificate, prezența

a numeroase repetiții inverse de diferite dimensiuni (avînd \sim lungimea SI 1, SI 2, SI 3, SI 4 și $\gamma\delta$), care mărginesc segmente de ADN lungi de \sim 22, 28 și 69 kb. După Chow (1977); \sim 14% din întregul cromosom este situat între repetiții inverse. Acest tip de organizare, care evidențiază o configurație cel puțin topologic echivalentă transpozonilor, sugerează că modalitatea majoră de producere a genelor duplicate la *E. coli* K12 a fost transpoziția materialului genetic dintr-o regiune în alta, cu menținerea unei copii în localizarea originală (Kleckner, 1977; Bachmann și Brooks-Low, 1980).



Structura fină a genei

„Genetica moleculară a luat naștere când s-a recunoscut că gena este 'subdivizibilă'”

SALVADOR LURIA

În concepția clasică, gena era definită ca o unitate indivizibilă de material genetic, transmisibilă ereditar, care poate fi caracterizată prin trei proprietăți esențiale: 1) comportarea ei ca o entitate în determinarea unui anumit caracter fenotipic (*unitatea de funcție*); 2) răspunsul ei ca un întreg la acțiunea agenților mutageni care determină o diferență fenotipică față de normal* (*unitatea de mutație*) și 3) capacitatea de a fi separată de alte gene prin recombinare genetică (*unitatea de recombinare*). Ca urmare, mutațiile și recombinările în cadrul aceleiași gene au fost considerate multă vreme ca imposibile.

Cercetările lui Benzer (1955, 1962) au revoluționat conceptul tradițional despre genă, demonstrând că funcțiile genei nu sînt proprietăți ale unei structuri simple și indivizibile, ci sînt atribute ale unor unități infragenice distincte, componente ale unei structuri complexe. El și-a pus problema dacă două sau mai multe mutații diferite, apărute separat, dar care au același fenotip (determină aceeași proprietate modificată a unui virus sau bacterie) au apărut în aceeași genă sau într-un număr de gene diferite.

Cercetările au fost efectuate asupra regiunii rII a fagului T4 și asupra triptofan sintetazei de la *E. coli*, utilizînd în special testul de complementaritate intergenică. Acest test a furnizat o bază operațională inițial foarte satisfăcătoare pentru definirea unității genetice de funcție. Descoperirea complementarității intragenice de către Fincham (1957), precum și de către Giles și colab. (1957) i-a diminuat însă valoarea. Complementaritatea reprezintă interacțiunea dintre două seturi de gene virale sau celulare, care permite celulei sau virusurilor să manifeste o anumită funcție, deși fiecare set de gene poartă o mutație la nivelul unei gene esențiale, care este nefuncțională în stare haploidă.

Studiile asupra regiunii rII a fagului T4

Benzer (1955) a adaptat la fag testul de complementaritate folosit anterior pentru a demonstra unitatea funcțională a genei la organisme superioare. Experiențele au fost efectuate pe fagul T4 *E. coli* standard

* Noțiunea de genă „normală” (de tip sălbatic) este arbitrară, deoarece toate genele au evoluat prin intermediul unor mutații succesive. Ea are, totuși, o importanță fundamentală în studiile de genetică pentru diferențierea unei alele (formă specifică a unei gene) de tip sălbatic (cu secvența nucleotidică „normală”) de alela mutantă (în care o anumită secțiune a secvenței normale a fost modificată prin mutație).

(de tip sălbatic) și pe un număr de peste 2 000 de mutante ale sale, care produc în cursul infecției *E. coli tulpina B*, o scurtare a ciclului de replicare și o apariție mai rapidă a plajelor de liză. Fagul de tip sălbatic produce în câteva ore plaje ale căror formă și mărime reprezintă o caracteristică ereditară, ce pot conține ~10 milioane fagi progeni, pornind de la o singură particulă. Mutantele *r* (rapid) se replică mai repede și produc plaje mai mari decât tipul sălbatic. Ele sunt consecința unor modificări mutaționale în 3 regiuni diferite ale genomului fagic, notate rI, rII și rIII.

Identificarea lor a fost făcută prin infectarea *E. coli B* cu fagii mutanți rI și rII, în proporție de 3 : 1 (fagi : bacterii) pentru a asigura infectarea tuturor celulelor. După replicare și liză, fagii progeni sunt dispersați pe suprafața unei culturi de *E. coli B*. Se formează plaje de tip *r* care conțin fagi de tip mutant, dar și plaje normale care conțin fagi de tip sălbatic rezultați prin recombinare genetică (fig. 84). Prin experiențe

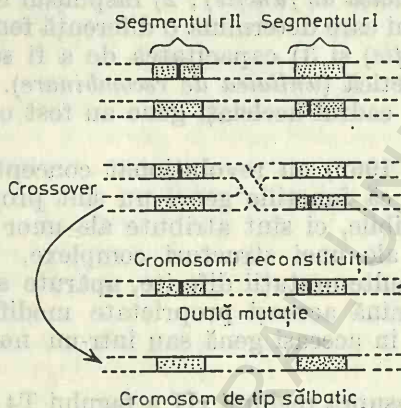


Fig. 84. — Efectul recombinării între genomurile a doi fagi T4, cu mutații localizate în situsuri diferite (rI și rII) (după Pierce, 1979).

de recombinare genetică s-a demonstrat că cele 3 regiuni sunt situate în genomul fagic în ordinea rII, rI, rIII. Benzer a ales pentru a face analiza fină a genei, fagii cu mutații în regiunea rII, care au pe lângă ciclul de replicare rapid o proprietate importantă suplimentară, datorită căreia pot fi ușor identificați: se adsorb, infectează, inițiază sinteza ADN și a altor produși fagici, dar sunt incapabili să lizeze *E. coli tulpina K*, după cum rezultă din tabelul nr. 16.

Tabelul nr. 16

Particularitățile de dezvoltare a fagilor de tip sălbatic și mutant r II, pe celule de *E. coli B* și *K*.

Fagul T4	<i>Escherichia coli</i>	
	Tulpina B	Tulpina K
Tipul sălbatic (r^+)	Plaje mici	Plaje mici
Tipul mutant (r^-)	Plaje mari	—

Testele de complementaritate

Testul de complementaritate („complementation test”) este bazat pe observația că infecția mixtă a *E. coli* *K* cu fagi *rII*⁺ (de tip sălbatic) și *rII* mutant determină dezvoltarea ambelor tipuri de fagi. Explicația ar fi că gena normală *r*⁺ a fagului sălbatic asigură sinteza unui produs (probabil un polipeptid), pe care tipul mutant nu îl poate face. Dar, fagul sălbatic asigură sinteza unei cantități suficiente a acestui produs, care difuzează în citoplasma bacteriană, asigurând nu numai propria sa dezvoltare, ci și a tipului mutant, permițând astfel ambelor tipuri de fagi să lizeze bacteriile de tip *K* (efect de complementare). În termeni de genetică, în infecția mixtă, gena *r*⁺ (de tip sălbatic) este dominantă față de alela sa *rII* mutantă.

Testul de complementaritate a fost realizat prin infecția mixtă a *E. coli* *K*, simultan cu două mutante fagice diferite, pentru a vedea dacă cele două tipuri de particule incapabile să crească separat pe tulpina *K*, sînt capabile să coopereze pentru a produce fagi progeni. Dacă perechea de mutante este capabilă să coopereze, concluzia este că cele două mutații nu afectează aceeași regiune a genomului. Incapacitatea de cooperare demonstrează că ambele mutații au apărut în situsuri genetice care aparțin aceleiași unități funcționale a genomului fagic (fig. 85). În acest mod, s-a demonstrat că regiunea *rII* este alcătuită din două subregiuni A și B, cu funcții bine definite. Este probabil că polipeptidele codificate de cele

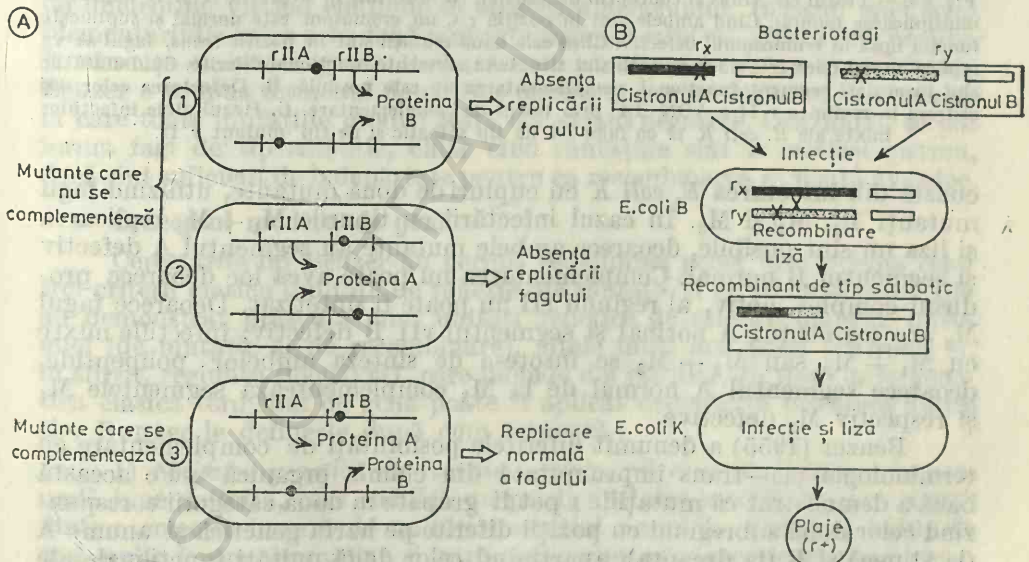


Fig. 85. — A. Demonstrarea prezenței a două gene *rII* la fagul T4. Celulele de *E. coli* *K12* (λ) care nu permit multiplicarea unui fag mutant *rII* au fost infectate simultan cu doi fagi mutanți *rII*. Mutațiile au fost localizate prin teste de recombinare, fie ambele în segmentul A (1), fie ambele în segmentul B (2), fie cite una în fiecare segment (3). În (1) se produce numai proteina B și în (2) numai proteina A. Multiplicarea virală este absentă în ambele cazuri, cu excepția unui număr mic de celule, în care a fost produs fag de tip sălbatic prin recombinare genetică. În (3) au fost produse ambele proteine (A și B), iar multiplicarea virusului a avut loc în toate celulele. B. Tehnica a fost utilizată de Benzer pentru a detecta recombinanții de tip sălbatic între două mutații *rII*, care afectează același cistron (după Davis și colab., 1976).

regiunii rII din genomul fagice. Mutatiile dintr-o unitate funcțională le completează pe cele din altă subregiune, în cursul infecțiilor mixte ale *E. coli K*, dar nu și pe cele din propria lor categorie.

Efectul poziției *cis-trans*. Testul de recombinare. Unul din efectele cele mai evidente al poziției mutațiilor este *efectul cis-trans*, care poate fi evidențiat prin recombinare genetică. Comparatia *cis-trans* nu este posibilă în mod obișnuit în condiții de haploidie. De aceea, în cazul fagilor spre exemplu, se recurge la infecția dublă a bacteriilor cu două mutante fagice. Testul de recombinare constă deci din infecția mixtă a *E. coli B*, permissivă, cu două tipuri de fagi mutanți, creînd posibilitatea replicării și recombinării prin reasortarea informației genetice parentale, urmată de testarea fagilor progeneri prin însămînțare pe *E. coli K*.

Benzer a infectat *E. coli B* cu ~ 2 400 tipuri de fagi cu mutații în rII din colecția sa, în cupluri de doi câte doi și a înregistrat frecvența de recombinare. Frecvența apariției plajelor normale (r^+) pe *E. coli K* indică frecvența de recombinare între două mutante fagice originare.

Tehnica este foarte sensibilă, deoarece permite detectarea unui fag recombinant chiar la un miliard de progeneri, cu posibilitatea de a discrimina prezența a două mutații diferite, chiar dacă sînt extrem de apropiate (la distanță de numai o pereche de baze). Aceasta demonstrează că recombinarea genetică poate discerne chiar situsurile adiacente, reprezentate de nucleotide virtual contigue în structura genomului. În cazul unei complementarități între cele două mutante fagice, testul *cis-trans* este pozitiv. În absența ei, este negativ. Pe baza unui număr mare de teste *cis-trans*, Benzer a propus termenul de *cistron* pentru a descrie regiunea din genom în care toate mutațiile produc teste *cis-trans* negative. Ocazional, se pot forma fagi de tip sălbatic, chiar cînd mutațiile sînt în același cistron, dacă sînt suficient de îndepărtate pentru ca recombinarea să poată avea loc.

Conceptul modern de genă

Cercetările lui Benzer au permis redefinirea genei prin prisma celor trei criterii clasice (unitate de funcție, de mutație și de recombinare). Ele au demonstrat prezența unor unități genetice de diferite mărimi, unele mici (de mutație și de recombinare), altele mult mai mari (cistroni) și, în sfîrșit, regiunea (locus) rII, care include doi cistroni. În timp ce în genetica clasică termenul de genă poate fi aplicat deopotrivă oricăreia dintre ele, Benzer le definește după cum urmează:

1) *Unitatea genetică de funcție* — *cistronul* este o regiune cromosomală bine definită, care codifică un produs celular specific și care constă dintr-o colecție lineară de unități potențial mutabile, care pot exista în mai multe forme alternative și între care se pot produce recombinări genetice (crossover). Cistronii pot conține cîteva sute de unități minime de mutație și de recombinare. Cistronii A și B ai regiunii rII T4 sînt formați din 1 700, respectiv 1 100 perechi de nucleotide.

2) *Unitatea genetică de mutație* — *mutonul* corespunde celui mai mic segment din ADN, a cărui alterare determină apariția unei forme mutante a virusurilor sau a bacteriilor. Cea mai mică unitate mutațională este reprezentată de un nucleotid individual.

3) *Unitatea genetică de recombinare* — *reconul* corespunde celei mai mici părți din ADN interschimbabilă, dar indivizibilă, prin recombinare genetică. Ea corespunde de asemenea unui nucleotid individual. Inițial s-a considerat că recombinarea genetică are loc numai între gene diferite nu și în cadrul genei. Această concepție era determinată de faptul că recombinarea între două regiuni mai îndepărtate este mai ușor de detectat, în timp ce între două regiuni apropiate este foarte rară.

Cercetările asupra triptofan sintetazei de la *E. coli*

Celulele de *E. coli* de tip sălbatic conțin o enzimă activă *triptofan sintetaza*, care catalizează o reacție complexă între indolglicerolfosfat și serină pentru a produce triptofan și glicerolfosfat. Întrucât o serie de mutante pierd capacitatea de a o sintetiza, s-a încercat să se determine printr-o serie de teste de complementaritate, dacă toate mutațiile au apărut într-o singură „genă” sau în mai multe „gene” ai căror produși diferiți se asociază pentru a forma enzima activă. Testarea s-a făcut prin reunirea în aceeași celulă a două genomuri haploide, fiecare purtând o mutație independentă, afectând aceeași funcție. Cele două mutații fiind localizate în genomuri diferite sînt în poziția *trans*. Totodată a fost construită a doua celulă diploidă în care ambele mutații sînt în aceeași genă, adică în poziția *cis*.

Fig. 87 evidențiază că atunci cînd cele două mutații sînt localizate în cistroni diferiți, atât diploidul *cis*, cît și cel *trans* vor produce aceeași cantitate de produs activ ca și bacteria haploidă de tip sălbatic. În cazul *cis* funcționează cistronii A și B ai genomului normal (nemutant). În cazul *trans* acționează cistronul B de la un genom și cistronul A de la cel de-al

MUTAȚII ÎN GENE DIFERITE

MUTAȚII ÎN ACEEAȘI GENĂ

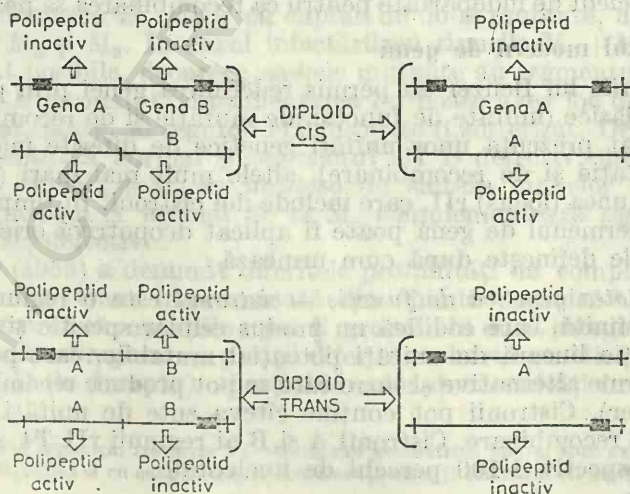


Fig. 87. — Testul *cis-trans* de funcție genetică. Dacă cele două mutații (dreptunghiuri negre) sînt localizate în gene diferite, diploidul *trans* produce tot atît produs activ al genei cît și diploidul *cis* (stînga, sus și jos). Cînd cele două mutații sînt în aceeași genă, numai diploidul *cis* sintetizează produsul activ al genei.

doilea. Cînd mutațiile sînt în aceeași genă, diploidul *cis* va produce aceeași cantitate de produs activ ca și bacteria haploidă de tip sălbatic, în timp ce diploidul *trans* nu va produce deloc sau va produce doar o cantitate foarte mică, datorită unei complementări intragenice (Stanier și colab., 1970). Studiul unui număr de tulpini mutante, în cupluri de cite două a confirmat că triptofan sintetaza activă este formată din două proteine (A și B), produși a două unități genetice diferite ca funcție.

Complementarea intragenică sau interalelică constă din producerea unui anumit grad de complementaritate între două seturi de gene care au o mutație în aceeași genă, dar într-un situs diferit. Întîlnită în cazul enzimelor alcătuite din două sau mai multe subunități identice, ea constă din formarea de molecule funcționale (active) hibride, produse prin asocierea unor subunități (monomere) nefuncționale. Fig. 88 ilustrează acest mecanism.

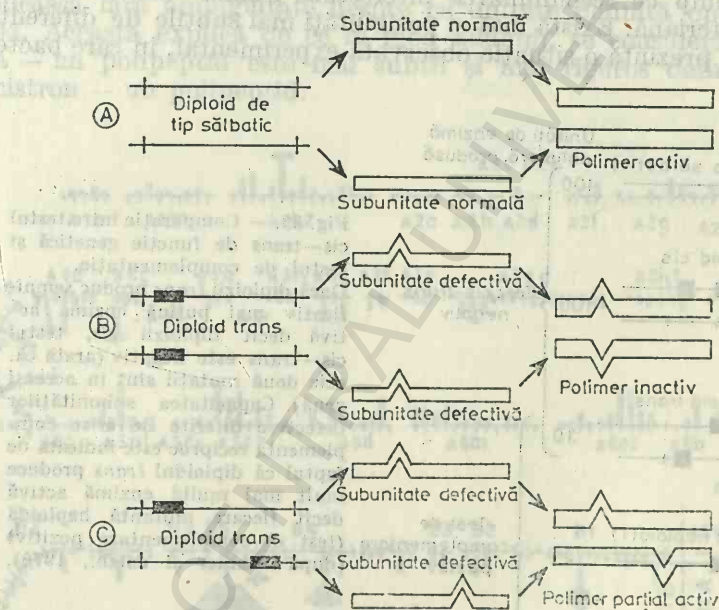


Fig. 88. — Complementarea intragenică. A. Dacă într-o celulă diploidă ambele alele ale genei sînt de tip sălbatic, subunitățile care reprezintă produșii genei se agregă pentru a produce enzima polimeră activă. B. Dacă ambele alele ale diploidului poartă aceeași mutație, subunitățile defective produse se vor agrega pentru a forma o enzimă polimeră inactivă. C. Dacă cele două alele ale diploidului poartă mutații diferite și distanțate, subunitățile defective produse se pot agrega pentru a forma un polimer cu activitate parțială (după Stanier, 1976).

Cînd cele două alele poartă aceeași mutație, subunitățile defective se agregă, dar formează un polimer inactiv. Dacă cele două alele poartă mutații în poziții diferite și suficient de îndepărtate, cele două subunități defective produse se pot agrega într-un polimer parțial activ. Interacțiunea mutuală a doi monomeri defectivi, cu anomalii diferite, într-un dimer hibrid, poate corecta o conformație anormală minoră a structurii lor

tertiare. Se consideră că în cursul unirii lor pentru a forma dimerul, prin stabilirea unor legături reciproce slabe, rezultă un stress intern care poate corecta configurația anormală, restabilind alăturarea monomerilor necesară pentru producerea situsului activ al enzimei. Modelul explică relativa raritate a complementarității intragenice, deoarece numai un număr limitat de anomalii speciale pot fi corectate pe această cale. Ea a fost demonstrată la *E. coli* și în cazul fosfatazei alcaline (enzimă dimeră) și al β -galactozidazei (tetrameră).

Comparație între testul de complementaritate și testul cis-trans. Manifestări de tipul celor descrise anterior pot apărea, după cum au arătat Beadle și Tatum (1945) la *Neurospora*, fie datorită complementarității, fie consecutiv unor recombinări genetice. Din punct de vedere practic este important de diferențiat mecanismul molecular al fenomenului observat. În primul rând, este de remarcat că prin complementare sînt afectate toate celulele, în timp ce recombinarea interesează numai cîteva celule din populația bacteriană. Există însă și posibilități mai subtile de diferențiere. Astfel, fig. 89 prezintă o situație observată experimental, în care bacteriile

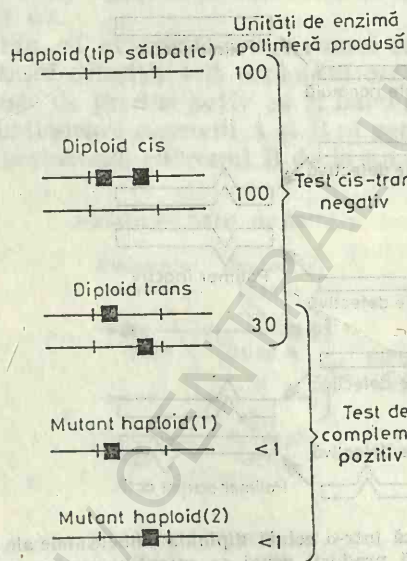


Fig. 89. — Comparație între testul cis-trans de funcție genetică și testul de complementație. Dacă diploizii *trans* produc semnificativ mai puțină enzimă activă decât diploizii *cis*, testul cis-trans este negativ (arată că cele două mutații sînt în aceeași genă). Capacitatea subunităților defective diferite de a se complementa reciproc este indicată de faptul că diploidul *trans* produce mult mai multă enzimă activă decât fiecare mutantă haploidă (test de complementare pozitiv) (după Stanier și colab., 1976).

haploide de tip sălbatic produc 100 unități ale unei enzime polimerice. Celulele diploide *cis*, care poartă două mutații, produc tot 100 de unități enzimatic, datorită prezenței unei gene funcționale, în timp ce diploidul *trans* produce numai 30 unități.

Testul cis-trans este negativ, deoarece cele două mutații sînt localizate în aceeași genă. Testul de complementaritate este însă pozitiv: capacitatea subunităților enzimatic defective de a se complementa unele pe altele este demonstrată de faptul că diploidul *trans* produce mult mai multă enzimă activă (30 U.), decât cele două mutante haploide (< 1 U.).

Conceptul de cistron și consecințele sale teoretice și practice

Conceptul de cistron definit ca o unitate genetică de funcție relevantă prin testul cis—trans marchează, după Stent (1974), un important progres în dialectica eredității, deși nu a fost unanim adoptat. El îl folosește ca echivalent cu cel de genă, dar referindu-se exclusiv la unitatea genetică de funcție. După Birge (1981), termenul de cistron este mai precis decât cel de genă, care nu are o definiție operațională, deși în foarte multe lucrări sînt folosite ca echivalente. El consideră denumirea de genă ca adecvată segmentelor de ADN mai puțin riguros definite, cum ar fi cele care suferă procesul de „înnădire” („splicing”). Cu toate acestea, termenul de genă nu a fost înlocuit prin cel de cistron și probabil nici nu va fi înlocuit. Este evident că noțiunea de genă este perfect acceptabilă atît timp cît se lucrează la un nivel superior de integrare, pentru care nu se face nici o diferențiere referitor la unitatea implicată. De aceea, este esențial să se stabilească fără ambiguitate despre ce unitate definită operațional este vorba. Aceasta explică de ce în mod unanim, se consideră că relația o genă — un polipeptid este mai subtil și mai riguros definită în forma un cistron — un polipeptid.

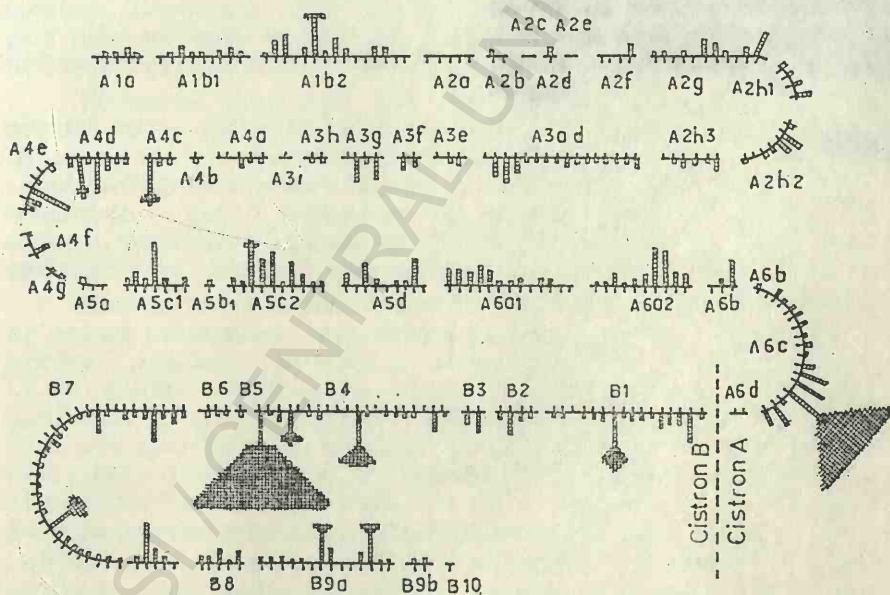


Fig. 90. — Harta regiunii r II cu înregistrarea unui număr mare de mutații apărute independent. Fiecare pătrat reprezintă o mutație independentă. În mod evident, unele mutații apar mai frecvent la anumite situsuri, în raport cu altele (după Benzer, 1961).

Harta genetică fină a regiunii rII

Utilizînd rezultatele experimentelor sale, Benzer (1955, 1962) a construit harta genetică a regiunii rII, sub forma unei secvențe continue de situsuri mutabile, care pot fi decelate prin recombinare genetică. Ea

înregistrează poziția a 1 612 mutații spontane în peste 350 de situsuri diferite, fiecare reprezentând un nucleotid individual, într-o formă lineară, ceea ce pledează pentru ideea că gena însăși este lineară (fig. 90). Topografia mutațiilor spontane pe harta genetică este complexă. Unele situsuri sînt mai mutabile decît altele, în timp ce două numite „pete calde” („hot spots”), situate între A6c și A6d și între B4 și B5, apar ca foarte mutabile. Deoarece ele sînt formate din baze obișnuite, se consideră că sensibilitatea lor specială la mutații s-ar datora influenței secvențelor de baze învecinate. Există și „situsuri zero” în care nu a apărut sau nu a fost decelată nici o mutație. Aceste date permit supoziția că frecvența diferită a mutațiilor spontane n-ar fi cu totul întîmplătoare.

FUNCȚIILE MATERIALULUI GENETIC

Materialul genetic este replicat, ceea ce înseamnă că este înalt în urma diviziunii celulei în două celule, astfel încât fiecare celulă să aibă o copie a materialului genetic. Acesta este un proces foarte precis și este controlat de enzimele care asigură fidelitatea replicării. Replicarea ADN este deosebit de importantă pentru că asigură transmiterea informației genetice de la părinți la copii. Fiecare celulă trebuie să aibă o copie corectă a materialului genetic pentru a funcționa corect. Dacă materialul genetic este replicat în mod corect, celula va funcționa corect și va produce copii corecte. Dacă materialul genetic este replicat în mod eronat, celula va funcționa eronat și va produce copii eronate. Acesta este motivul pentru care replicarea ADN este atât de importantă.

A. KORNBERG

Materialul genetic este replicat în mod corect datorită faptului că enzimele care asigură fidelitatea replicării sunt foarte precise. Replicarea ADN este deosebit de importantă pentru că asigură transmiterea informației genetice de la părinți la copii. Fiecare celulă trebuie să aibă o copie corectă a materialului genetic pentru a funcționa corect. Dacă materialul genetic este replicat în mod corect, celula va funcționa corect și va produce copii corecte. Dacă materialul genetic este replicat în mod eronat, celula va funcționa eronat și va produce copii eronate. Acesta este motivul pentru care replicarea ADN este atât de importantă.

FUNCȚIILE MATERIALULUI GENETIC

În cele din urmă, structura ADN
trebuie înțelesă în raport de toate
funcțiile sale, așa cum înțelegem
funcțiile necesită o cunoaștere a
structurii. Fiecare funcție trebuie des-
compusă, apoi reconstituită în deta-
liile sale moleculare și, în final, ori-
entată în arhitectura și economia ce-
lulare.

A. KORNBERG

Replicarea ADN*

(Pl. 7, 11, 17—19)

„Modul în care ADN este replicat în Escherichia coli (și în alte celule) reprezintă astăzi una din cele mai captivante probleme ale biologiei moleculare”.

D. T. DENHARDT

Materialul genetic este replicat, adică este reprodus întocmai, astfel încît în urma diviziunii celulare informația genetică purtată de el este transmisă ca atare celulelor-fiice. Complementaritatea bazelor determină o structură ideal adaptată pentru replicare pentru că, după separarea celor două catene ale moleculei de ADN, fiecare dintre ele poate acționa ca „template” (model sau matriță) pentru sinteza unei noi catene complementare. Replicarea ADN este deci un proces biochimic foarte specific, prin care secvența bazelor din catena de ADN, servind drept matriță, dictează secvența bazelor catenei noi în curs de constituire.

Formarea unor copii care sînt identice cu materialul servind ca matriță sau model se bazează pe o caracteristică generală a proceselor de tip „template” în ereditate, și anume aceea că nu există nici o restricție chimică obligatorie pentru ordinea în care diferiți monomeri — blocuri de construcție — pot fi polimerizați în structuri macromoleculare, singurul criteriu preexistent cu caracter obligatoriu fiind conformitatea cu particularitățile de structură ale modelului sau matriței corespunzătoare.

Mecanismul de copiere exactă reprezentat de replicarea ADN asigură nu numai conservarea caracterelor normale, specifice, dar și conservarea oricărui „accident” survenit în cursul replicării. Mecanismele replicării nu sînt absolut infailibile și o „greșală” o dată apărută — cum se întîmplă accidental în cazul mutațiilor — este păstrată, reprodusă și multiplicată, dacă prin apariția sa nu afectează însăși viața celulei în care a apărut (așa cum o fac mutațiile letale). Replicarea ADN este un proces foarte complex asemănător unei căi metabolice, în care o moleculă inițială A este transformată pe calea unor intermediari metabolici B, C, D pentru a forma două molecule de A. Ca și în cazul căilor metabolice, înțelegerea mecanismului replicării ADN implică cunoașterea precisă a structurii ADN (substratul inițial), izolarea, caracterizarea și așezarea formelor intermediare într-o succesiune logică din momentul inițierii pînă la terminare și descifrarea modului în care un intermediar este transformat în altul.

* Ținînd seama de importanța lor majoră și de amploarea informației, funcțiile materialului genetic implicate în variabilitate și evoluție, precum și cele referitoare la reglarea activităților celulare sînt prezentate în două secțiuni separate ale volumului.

Deși informația genetică este conținută într-o moleculă cu o structură intrinsec adaptată pentru replicare, descifrarea mecanismului ei întâmpină multe dificultăți deoarece: 1) nu se realizează după un model unitar sau, ceva mai mult, începe după un model și se termină cu altul; 2) este realizată de sisteme multienzimatice complexe; 3) nici o ADN polimerază nu poate iniția sinteza *de novo* a unei catene noi; 4) este complicată de existența unor constrângeri structurale și funcționale, decurgând din orientarea antiparalelă a celor două catene ale ADN și din faptul că toate ADN polimerazele sintetizează numai în direcția $5' \rightarrow 3'$.

Modul de replicare a ADN

Structura dublu helicală și orientarea antiparalelă a catenelor ADN au sugerat posibilitatea existenței a trei modalități distincte de replicare:

1) Replicarea de tip conservativ care s-ar putea realiza în două variante:

a) cele două catene ale moleculei parentale ar rămâne unite în cursul replicării și ar transmite informația genetică, într-un mod necunoscut, unei molecule noi, care ar fi sintetizată *in toto*;

b) cele două catene s-ar separa temporar și ar acționa, fiecare, ca matriță, după care atît catenele vechi, cît și cele noi s-ar reuni în molecule dublu helicale.

2) Replicarea de tip dispersiv s-ar face fără conservarea integrității structurii catenelor parentale și ar consta din fragmentarea lor transversală, urmată de reincorporare în structuri neoformate. În felul acesta, moleculele-fiice de ADN ar conține atît resturi din vechea moleculă, cît și porțiuni nou sintetizate. Acest mecanism este greu de conceput, deoarece păstrarea caracterelor speciei ar implica fragmentarea totdeauna la același nivel, urmată de reasociere după o ordine fixă.

3) Replicarea de tip semiconservativ, sugerată de modelul Watson—Crick, implică separarea celor două catene în cursul replicării, pentru ca fiecare dintre ele să servească drept matriță pentru sinteza unei catene complementare. Replicarea este urmată de reasocierea acestora, în așa fel încît o moleculă de ADN d.c. neoformată în prima generație este un „hibrid” alcătuit dintr-o catenă parentală — matrița — și alta nou sintetizată (fig. 91).

Caracterul semiconservativ al replicării ADN la bacterii a fost demonstrat de Meselson și Stahl (1958), cu ajutorul tehnicilor de separare a moleculelor de ADN, în funcție de densitatea lor, prin centrifugare în gradient de CsCl.

Principiul metodei. Dacă o soluție concentrată de CsCl 7 M (cu densitatea $\sim 1,70$) este centrifugată la viteze mari, timp îndelungat, moleculele individuale se distribuie în cîmpul centrifugal după un gradient de densitate. Densitatea soluției este foarte mare la fundul tubului și scade treptat spre suprafața lichidului. Cînd într-o astfel de soluție salină se adaugă o substanță cu densitate necunoscută — în acest caz ADN — moleculele acesteia se vor depune într-o anumită bandă a gradientului de CsCl,

respectiv în zona în care densitatea moleculelor de sare corespunde densității de plutire a substanței date (respectiv într-o poziție care corespunde propriei sale densități). Ca urmare, ADN „greu”, „ușor” sau „hibrid” va ocupa și forma benzi corespunzătoare densității lor, putînd fi detectate cu ajutorul radiațiilor UV cu $\lambda = 260$ nm.

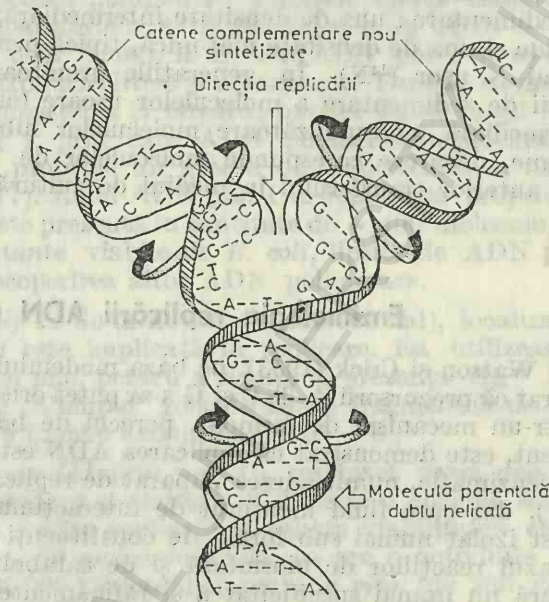


Fig. 91. — Mecanismul replicării în „Y” a moleculei de ADN. Săgețile negre curbate indică direcțiile de rotație a catenelor. Cele două catene noi cresc în direcție descendentă.

Fig. 92 prezintă schematic experiența lui Meselson și Stahl. Celulele de *E. coli* cultivate pe mediu cu ^{15}N , ca unică sursă de N, conțin numai ADN „greu”. Dacă sînt transferate într-un mediu cu ^{14}N stabil și men-

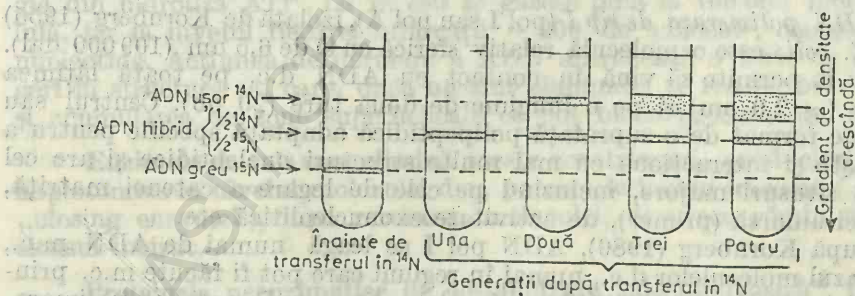


Fig. 92. — Replicarea semiconservativă a ADN. ADN din culturile dezvoltate în prezența $^{15}\text{NH}_3$ și apoi trecute în $^{14}\text{NH}_4$ este extras la diferite intervale după transfer și bandat prin centrifugare la echilibru în gradient de densitate în CsCl . Înainte de transfer, ADN este greu (^{15}N); o generație după transfer, este hibrid (o catenă ^{15}N , alta ^{14}N); în generațiile următoare, o cantitate constantă de ADN este hibridă și o proporție crescîndă de ADN este ușoară (^{14}N). Benzile hibride conțin catene existente înainte de transfer, care formează moleculele d.c. cu ADN nou sintetizat.

ținute o perioadă de timp, corespunzând unei singure generații, bacteriile vor conține ADN care sedimentează într-o zonă de densitate intermediară, deoarece moleculele de ADN noi formate sînt alcătuite dintr-o catenă veche (^{15}N), care a servit ca matriță și una nouă ușoară (^{14}N), complementară față de ea. Dacă durata cultivării pe mediul cu ^{14}N este mai mare, permițînd două diviziuni celulare, ADN se depune în două benzi de sedimentare: una de densitate intermediară, caracteristică moleculelor hibride și una de densitate mai mică, tipică pentru moleculele care conțin numai N ușor (^{14}N). În generațiile următoare se constată extinderea benzii de sedimentare a moleculelor ușoare (cu ^{14}N), în timp ce banda intermediară, corespunzătoare moleculelor hibride își păstrează aceeași mărime, deoarece corespunde moleculelor de ADN greu (^{15}N), sintetizate anterior transferului în mediul de cultură cu N stabil.

Enzimologia replicării ADN la bacterii

Watson și Crick (1953), pe baza modelului de structură al ADN, au sugerat că precursorii A, T, C și G s-ar putea orienta singuri, pentru a forma, printr-un mecanism de fermoar, perechi de baze pe catena matriță. În prezent, este demonstrat că replicarea ADN este realizată de un complex multienzimatic, numit adesea „aparat de replicare” (Albert și Sternglanz, 1977), dar care fiind menținut de interacțiuni proteină—proteină, slabe a fost izolat numai sub forma de constituenți proteici individuali. Ca și în cazul reacțiilor de biosinteză și de catabolism, intervenția enzimelor asigură nu numai specificitatea și rafinamentele de reglare, ci și rapiditatea de acțiune.

ADN polimerazele. În sistemele procariote funcționează trei ADN polimeraze dependente de ADN (ADN replicaze), potențial capabile să asigure sinteza moleculelor de ADN. Dintre acestea, cel puțin la *E. coli*, rolul major în replicare revine ADN pol III.

ADN polimeraza de tip I (pol I sau pol A), izolată de Kornberg (1955) de la *E. coli*, este o moleculă relativ sferică cu \varnothing de 6,5 nm (109 000 dal). Aceasta îi permite să vină în contact cu ADN d.c. pe toată lățimea acestuia ($\sim 2,0$ nm) și pe o lungime de două ture (20 pb). Centrul său activ este format de o suprafață polipeptidică adaptată specific pentru a recunoaște și interacționa cu mai multe structuri nucleotidice și are cel puțin 6 situsuri majore, incluzînd pe cele de legare a catenei matriță, a catenei amorsă (primer), de activitate exonucleolitică etc.

După Kornberg (1980), ADN pol I se leagă numai de ADN m.c., iar în cazul moleculelor d.c., numai în regiuni care pot fi făcute m.c. printr-o incizie sau la extremitățile moleculelor lineare. Funcția sa polimerazică este condiționată de o catenă preexistentă, care acționează ca „primer”, furnizînd un punct de creștere pe care enzima adaugă noi nucleotide și ca matriță pentru a dirija sinteza unei catene complementare. Sinteza de ADN are loc în direcția $5' \rightarrow 3'$ și se realizează prin adăugarea de unități mononucleotidice la extremitatea liberă $3' - \text{OH}$. Polimerizarea are loc cu o viteză de 667 nucleotide min/moleculă de enzimă, la 37°C .

În plus, ADN pol I are două funcții exonucleolitice complet distincte, deoarece acționează în direcții opuse ale ADN. Funcția de exonuclează $5' \rightarrow 3'$ determină excizia a ~ 10 nucleotide de-a lungul extremității $5'$, în timp ce funcția $3' \rightarrow 5'$ asigură excizia nucleotidelor, unul câte unul. Funcția de catalizator al polimerizării mononucleotidelor intervine în etapa finală a replicării, pentru „umplerea” golurilor dintre fragmentele Okazaki și în conversia reparatorie a ADN parțial m.c. în ADN d.c.

După Cairns și De Lucia (1969), la *E. coli* ADN pol I ar avea un rol esențial în activitatea exonucleolitică și reparatorie. Funcția exonucleolitică $3' \rightarrow 5'$ permite recunoașterea și elivarea bazelor legate greșit (funcția „proof-reading-editing”), prin care ADN polimerazele procariotelor recunosc și își corectează propriile lor greșeli de împerechere a bazelor (Alberts și Sternglanz, 1977). Rolul ADN pol. I în replicarea propriu-zisă ar fi accesoriu. La *E. coli* este prezentă în cantitate de ~ 400 molecule/celulă. Descoperirea unor mutante viabile de *E. coli*, lipsite de ADN pol I, a deschis drumul spre descoperirea altor ADN polimeraze.

ADN polimeraza de tip II de la *E. coli* ($\sim 120\,000$ dal), localizată în membrana plasmatică, nu este implicată în replicare. Ea utilizează ca matriță ADN d.c. cu incizii m.c. pentru a repara în prezența Mg^{2+} leziunile induse de UV și pentru „a umple” golurile dintre fragmentele de ADN sintetizate discontinuu. Are funcție exonucleazică $3' \rightarrow 5'$.

ADN polimeraza de tip III (sau pol O), produsul genei *dna E* la *E. coli*, descrisă de T. Kornberg și Geffter (1970), este o enzimă solubilă ($\sim 150\,000$ dal), esențială pentru replicare și pentru viabilitatea celulei. Prezentă în cantitate de ~ 20 molecule/celulă, ea are o activitate polimerazică de $\sim 60\,000 - 100\,000$ nucleotide/minut, *in vivo* (de 300 de ori mai mare decât ADN pol II și de 15 ori decât ADN pol I). La *E. coli* are rol primordial în replicarea ADN, în prezența unui „primer” și a Mg^{2+} . Nu poate iniția sinteza *de novo* a ADN și nu are activitate exonucleazică.

Enzimele de derulare reprezintă un grup de proteine care detorsionează catenele de ADN la nivelul bifurcațiilor de replicare, utilizând energia din hidroliza ATP. La *E. coli* se găsesc pînă la $100\,000$ molecule/celulă, iar la nivelul fiecărei bifurcații ~ 200 de molecule, complexate cu nucleotide. Acțiunea de derulare a ADN antrenează o serie de constrîngerii în structura sa, care, dacă nu sînt eliminate, se traduc prin apariția și acumularea de zone superhelicale ce pot bloca procesul de replicare.

Enzimele de relaxare elimină aceste constrîngerii, producînd secțiuni haplotomice la nivelul moleculei d.c., pe care le închid imediat („nicking-„closing enzyme”), după relaxarea moleculei, deoarece rămîn fixate pe situsul incizat.

Proteinele necenzimatice de destabilizare „destabilizează” d.c., deplasînd echilibrul ADN d.c./ADN m.c. în favoarea celui din urmă, pentru care au o afinitate mare și cu care se complexează, menținîndu-l într-o configurație extinsă.

ADN ligaza (polinucleotidligaza sau sealaza — engl. „to seal” = a închide) este o enzimă avînd în special rolul de a repara inciziile sau breșele într-o catenă a ADN d.c. (Gellert, 1967). Enzima izolată de la

E. coli este un monopectid, cu g.m. $\sim 75\,000$ dal, avînd rolul de a forma legături fosfodiester între o grupare 5'—fosforil a unui nucleotid și gruparea 3'—OH a altui nucleotid adiacent (fig. 93).

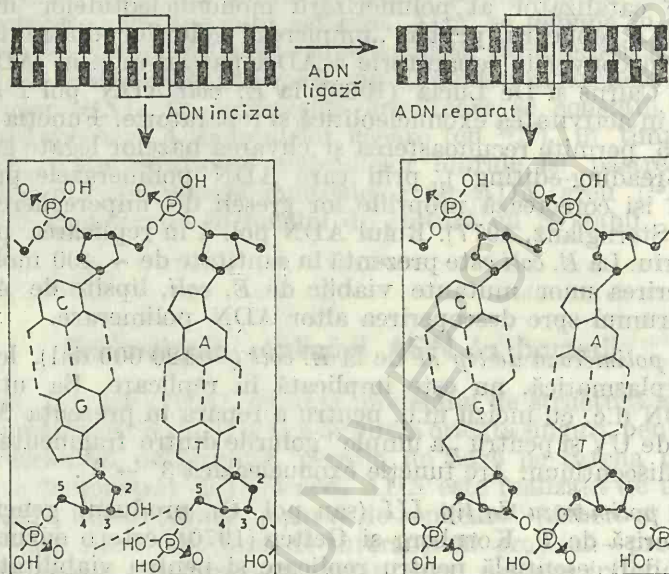
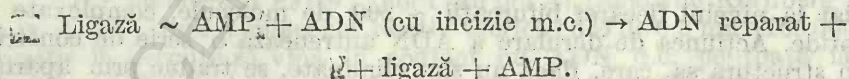
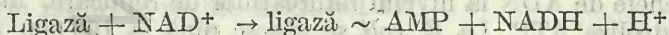


Fig. 93. — ADN ligaza repară inciziile monocatenare într-un dublu helix de ADN, catalizînd sinteza unei legături între fosfatul unui nucleotid și glucidul nucleotidului următor.

Spre deosebire de ligaza fagului T2, care necesită consum de ATP, ligaza bacteriană (*E. coli*) acționează în prezența NAD^+ , după reacția



ADN ligaza are un rol deosebit de important în replicare, reparare și recombinare, deoarece este singura enzimă capabilă să „închidă” inciziile monocatenare, restabilind continuitatea moleculelor de ADN. Intervenția sa a fost semnalată în conversia moleculelor de ADN lineare, cu extremități coezive în molecule circulare, în unirea fragmentelor Okazaki formate în cursul replicării ADN, în faza finală a proceselor de reparare și recombinare genetică, precum și în legarea „cap la cap”, cu mare eficiență a unor segmente de ADN complet separate, după unirea lor prin intermediul unor prelungiri m.c. etc. (Lehman, 1974).

La *E. coli* este prezentă în exces față de necesități (200—400 molecule/celulă), respectiv cam cît ADN polimeraza I. Dovadă este faptul că supraviețuiesc chiar mutantele la care cantitatea de ADN ligază este redusă la 1%. Date fiind relațiile funcționale dintre cele două enzime în

„umplerea” breșelor din structura ADN este posibil că anumite interacțiuni fizice între ele îmbunătățesc eficiența proceselor de replicare, reparare și recombinare.

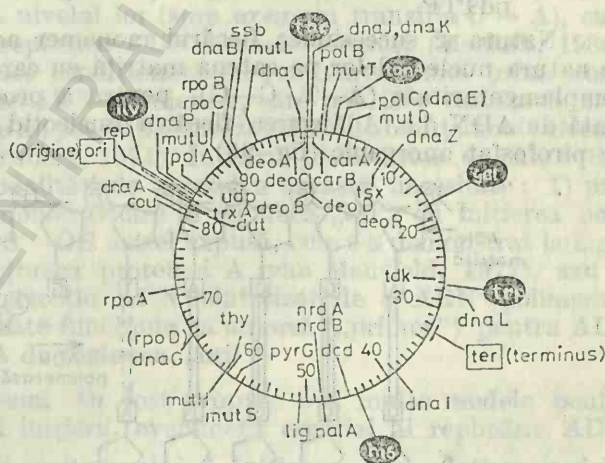
Biochimia polimerizării ADN

Materialul de construcție al ADN este reprezentat de dezoxiribonucleotid monofosfați, care, prin adăugarea unei grupări pirofosforil, devin precursori activați, dezoxiribonucleotid trifosfați. Ribonucleotidele sunt convertite la dezoxiribonucleotide, prin hidrogenarea ribozei la dezoxiriboză, în prezența NADH.

După Kornberg (1980) există două căi fundamental diferite de obținere a nucleotidelor intracelulare:

1) *Sinteza de novo*, în care ribofosfații, anumiți aminoacizi, CO_2 și NH_3 sunt combinați în reacții succesive pentru a forma nucleotide. În această cale, bazele purinice (A, G) și pirimidinice (T, C și U) libere, ca și nucleozidele nu sunt niciodată intermediari, deoarece sinteza nucleotidelor are loc fără ca să existe o etapă sau un stoc de baze sau nucleozide libere. Deși datele referitoare la enzimele care participă în biosinteza nucleotidelor la *E. coli* sunt destul de sumare, până în prezent au fost descrise 25 gene implicate în acest proces (fig. 94).

Fig. 94. — Harta genetică a *E. coli* K12, cu indicarea genelor implicate în biosinteza nucleotidelor (în interiorul cercului) și în replicarea ADN (în exterior) (după Taylor și Trotter, 1972).



2) *Calea de recuperare* („salvage pathway”) utilizează mecanisme diferite, prin care bazele și nucleozidele libere rezultate din degradarea acizilor nucleici sunt reconvertite în nucleotide (fig. 95). Bazele și nucleozidele pot fi recuperate din surse intra- sau extracelulare. Sursa internă rezultată din degradarea intracelulară a acizilor nucleici este în general neobservată, deși, după Kornberg (1980), eficiența ei depășește capacitatea constituenților extracelulari de a fi transportați în celule și de a compe-

tiționa cu precursorii produși endogen. Sursa extracelulară corespunde în cazul microorganismelor substanțelor prezente în mediile de cultură. Biosinteza ADN se face prin polymerizarea succesivă a celor 4 dezoxiribonucleotid 5'

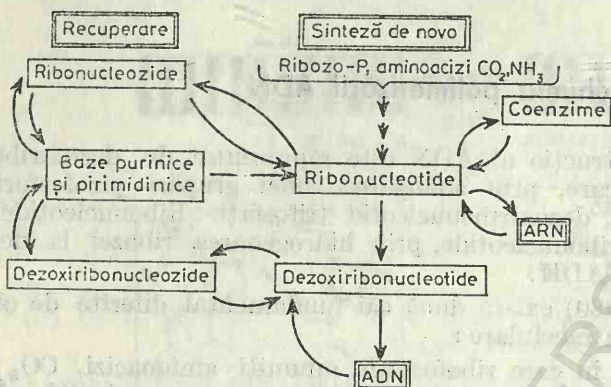
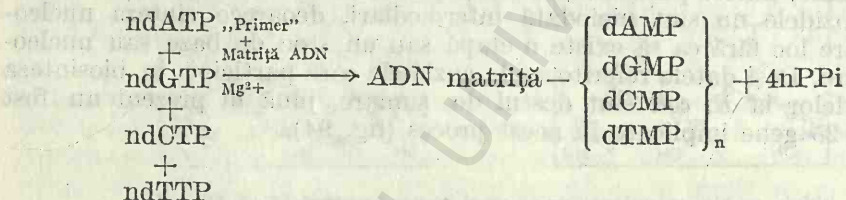


Fig. 95. — Biosinteza ADN prin calea *de novo* (dreapta) și calea de recuperare (stînga) (după Kornberg 1980).

trifosfați, într-o catenă dezoxiribonucleotidică, după reacția generală:



Natura și succesiunea fiecărui monomer adăugat sînt determinate de natura nucleotidelor pe catena matriță cu care se va lega pe bază de complementaritate (A—T, C—G), pentru a produce o moleculă neformată de ADN d.c. Adăugarea fiecărui nucleotid este însoțită de eliberare de pirofosfat anorganic (fig. 96).

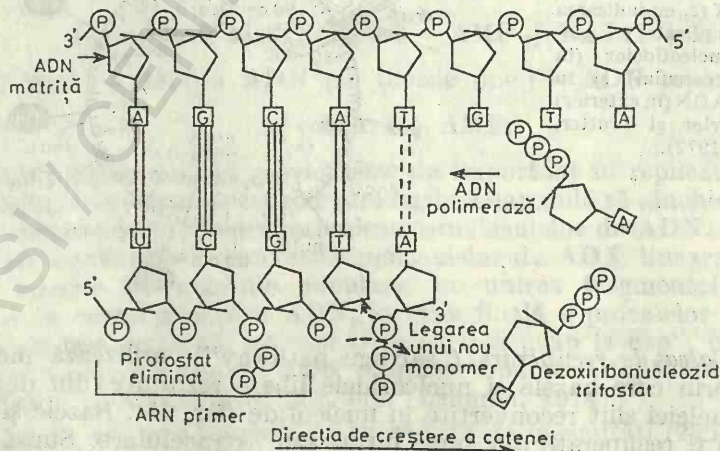


Fig. 96. — Biochimia polymerizării ADN. Sinteza este inițiată de ARN amorsă și constă din adăugarea dezoxiribonucleozid trifosfaților, în funcție de informația inclusă în ADN matriță. Catena crește în direcția 5' → 3' (după Berkaloff și colab., 1981).

Etapele replicării ADN

Studiul biochimic al replicării ADN *in vitro* a permis stabilirea a trei etape succesive de desfășurare a acestui proces, care au, în mod evident, corespondențe și în evoluția acestui proces în celula bacteriană.

Inițierea replicării. Inițierea este un proces complex multienzimatic, supus reglării de către celula bacteriană și intim cuplat cu creșterea acesteia. Ea are loc la situsuri specifice în replicon, numite „regiuni origine” („ori”) și constă din recunoașterea acestora de către factorii de inițiere, urmată de amorsarea replicării, de la nivelul lor sau din imediata vecinătate. Spre deosebire de eucariote, care au regiuni „ori” multiple pe replicon, celulele procariote au numai una singură.

Cu ajutorul tehnicilor de clonare a fost stabilită structura și secvența nucleotidică a mai multor regiuni „ori”, provenite de la fagi, virusuri animale, cromosomi bacterieni, plasmide și ADN mitocondrial. Ele au o serie de caracteristici comune: 1) grad mare de repetitivitate; 2) conținut mare în A—T, ceea ce presupune o mai mare ușurință de separare a celor două catene la acest nivel; 3) prezența unor secvențe repetate invers, care determină capacitatea de a forma structuri secundare (în „ac de păr” sau „frunză de trifoi”). Aceste structuri facilitează recunoașterea regiunilor „ori” de către enzimele și proteinele specifice de inițiere.

La *E. coli*, originea replicării este situată la ~ 83 minute pe harta genetică și are ~ 400 de baze. La fagul λ , regiunea „ori” conține 6 palindroame, dintre care unul cu 18 pb (repetat de 4 ori), este bogată în A—T și secvențe repetate în ordine inversă. Importanța regiunilor „ori” este evidențiată de mutațiile punctiforme la nivelul lor (spre exemplu tranziția C → A), care scad de 10 ori eficiența replicării ADN la unele virusuri (Mechali, 1980).

Inițierea sintezei este condiționată de rezolvarea unei prime complicații: spre deosebire de ARN polimeraze, care pot face sinteza *de novo* a ARN, ADN polimerizele nu pot iniția sinteza ADN în absența unei extremități libere 3'—OH (Kornberg, 1974). În cazul moleculelor de ADN d.c. circulare există două modalități de a rezolva această necesitate: 1) prin intermediul unei incizii monocatenare în regiunea „ori”, cu inițierea polimerizării la extremitatea 3'—OH astfel expusă, cum s-a demonstrat la fagul Φ X 174 *in vitro*, sub acțiunea proteinei A (van Mansfeld, 1977), sau 2) cu ajutorul unui oligonucleotid ARN sintetizat de o ARN polimerază autoamorsatoare, care poate funcționa ca amorsă („primer”) pentru ADN polimerază când se leagă de regiunea „ori”.

Conceptul de replisom. Au fost propuse mai multe modele pentru explicarea mecanismului inițierii, eveniment esențial al replicării ADN.

Modelul acumulării inițiatorului („Initiator accumulation model”) consideră că în cursul creșterii bacteriilor ar avea loc acumularea unei proteine inițiator, la o rată proporțională cu viteza globală a sintezei proteinelor. Inițierea ar avea loc ori de câte ori proteina inițiator s-ar acumula într-o cantitate adecvată per origine de cromosom (Helmstetter și colab., 1968; Donachie, 1968).

Modelul diluării inhibitorului („Inhibitor-dilution model”), propus de Pritchard și colab. (1969), consideră că inițierea replicării ar fi normal

reprezentată de un inhibitor. Cînd acesta este diluat sub o anumită concentrație critică în cursul creșterii, inițierea are loc.

Modelul replisomului (Bleecken, 1971) este bazat pe complexitatea inițierii la *E. coli*, condiționată de un sistem complex, care include interacțiunea a peste 10 proteine (produsele genelor *dna B*, *dna C-D*, *dna G*, proteine de legare a ADN, care mențin matricea într-o orientare corespunzătoare) și mai mulți factori proteici. Ele ar forma, în urma unui proces de maturare, o entitate funcțională și probabil structurală — *replisomul* — localizat într-o regiune a cromosomului (regiunea replisomală), care este replicată prima după inițiere. Viteza de maturare a replisomilor este proporțională cu viteza sintezei proteinelor (în cursul creșterii echilibrate a bacteriilor durata maturării este egală cu timpul de dublare a celulelor). Atît replisomii maturi (activi), cît și cei inactivi (fig. 97) ai cromosomului bacterian sînt legați la un situs comun pe membrana citoplasmatică.

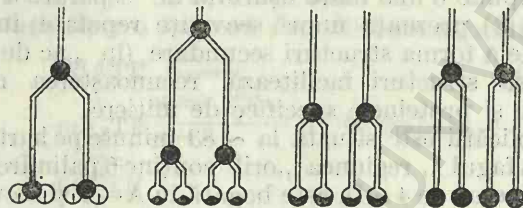


Fig. 97. — Reprezentarea schematică a replicării cromosomale și a maturării regiunilor replisomale ale cromosomului bacterian, în cursul ciclului celular. Cercurile negre reprezintă replisomi maturi. Mărimea sectoarelor de cerc din regiunea inferioară a figurii reprezintă gradul de maturitate al replisomilor imaturi (după Bleecken, 1971).

Inițierea replicării are loc numai după maturarea completă a replisomului, care acționează ca punct de amorsare a replicării. Terminarea unei runde de replicare distruge integritatea funcțională a replisomului și furnizează o condiție necesară pentru începutul procesului de diviziune celulară. După Davern (1979), replisomul ar fi în sinteza ADN echivalentul ribosomului în sinteza proteinelor. Deși nu este atît de complex ca ribosomii, replisomul este greu de studiat din două cauze: 1) este prezent în celulă numai în 5–10 copii, spre deosebire de ribosomi al căror număr depășește 10 000; 2) deși componenții individuali pot funcționa asociat în celulă, în absența punctului de creștere al ADN, ei nu formează complexe stabile.

Rolul ARN în replicarea ADN. Brutlag, Schekman și Kornberg, (1971) au emis pe baza capacității ARN polimerazei de a iniția sinteza ARN *de novo*, ipoteza formării unui scurt fragment de ARN-amorsă (ARN „primer”). Ca urmare, punctul start al replicării ADN este recunoscut nu de ADN polimerază, ci de ARN polimerază care formează *in situ* un scurt fragment de ARN „ori”, după care părăsește matricea de ADN. Sinteza ADN continuă prin intrarea în acțiune a ADN pol. III, care adaugă dezoxiribonucleotide pe extremitatea 3'—OH a ARN „primer” (fig. 98).

După Nossal (1983), sinteza ARN „primer (ARN „ori”) este precedată de o fază de *preinițiere* sau de *preamorsare* („prepriming”). La *E. coli* ea implică participarea a cel puțin 6 proteine: proteinele *dna B*, *dna C*

și a factorilor i , u' , n și n'' (respectiv x , y și z după nomenclatura lui Wickner și Hurwitz, 1981). După Kornberg (1981, 1982) cele 6 proteine ar interacționa pentru a forma o entitate numită *primosom*, care circulă în direcția $5' \rightarrow 3'$ de-a lungul ADN, în situsurile de inițiere.

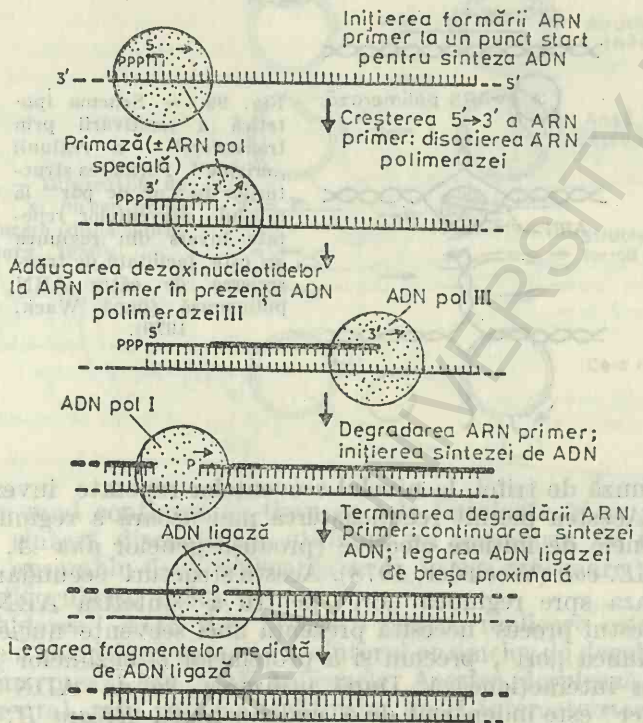


Fig. 98. — Utilizarea ARN ca amorsă (primer) în inițierea sintezei de ADN (după Watson, 1977).

În sinteza ARN „primer” a fost implicată o altă enzimă, *ADN primaza*, produsul genei *dna G*, care lucrează numai în asociere cu produsul genei *dna B*, o ATPază dependentă de ADN, capabilă să alunece de-a lungul ADN m.c., în timp ce defosforilează ATP. Ea acționează ca un „promotor mobil” care marchează, la anumite distanțe, pozițiile pentru sinteza ARN „primer” de către ADN primază (Rehkrantz, 1978). Nu se cunoaște în prezent importanța relativă a celor două enzime, ARN polimerază și ADN primază. Regiunea „ori” a *E. coli* conține 2—4 situsuri de interacțiune cu primaza și 24 de secvențe Pribnow pentru ARN polimerază. Este posibil ca ambele enzime să fie implicate în inițiere, fie în asociere, fie, separat, în funcție de natura sistemului biologic în care funcționează (Wackernagel, 1980).

Dove și colab. (1971), precum și Moore și colab. (1979) au propus un model particular de inițiere a replicării la fagul λ , numit de *activare a transcrierii* („transcriptional activation”). După acest model, rolul ARN

polimerazei ar fi indirect, deoarece transcrierea controlată în vecinătatea regiunii „ori” facilitează inițierea sintezei de ARN „primer” de către ADN primază. Fig. 99 arată că transcrierea, prin separarea catenelor, amorsează formarea unor structuri secundare de ADN, în „ac de păr” sau în

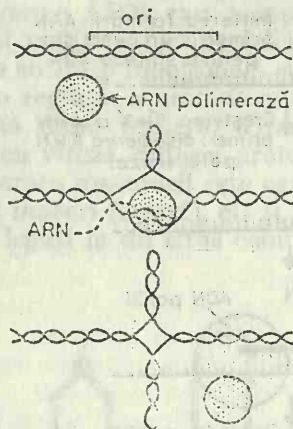


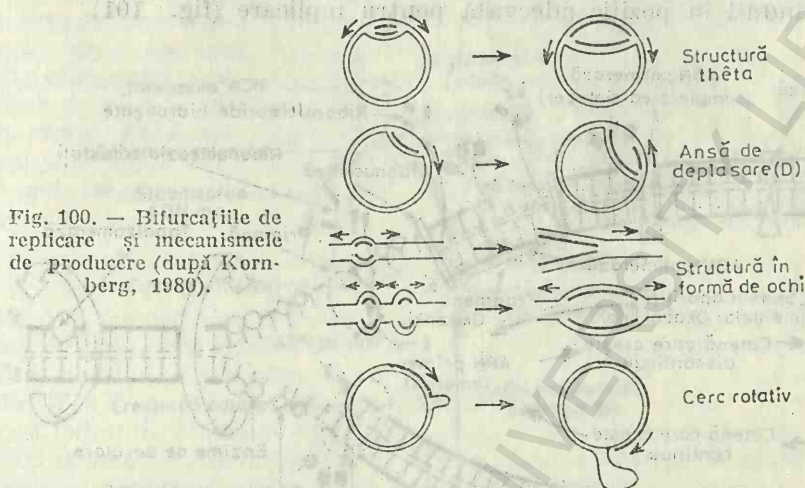
Fig. 99. — Schema ipotetică a „activării prin transcriere” a regiunii „origine”. Formarea structurilor în „ac de păr” la nivelul secvențelor repetate invers din regiunea ori este facilitată de transcrierea de către ARN polimerază (după Wack, 1979).

formă de frunză de trifoi, la nivelul secvențelor repetate invers din regiunea „ori”. Acestea permit recunoașterea mai ușoară a regiunii „ori” de către proteinele de inițiere efective (produșii genelor *dna A*, *dna B* sau *dna C* de la *E. coli* (Wechsler, 1978). Aceste structuri secundare pot dirija ADN primaza spre regiunea „ori” pentru a sintetiza ARN „primer”. Reglarea acestui proces necesită prezența unei secvențe nucleotidice normale în regiunea „ori”, precum și a proteinelor și enzimelor necesare, cu care aceasta interacționează. După utilizarea sa de ADN polimerază, ARN „primer” este îndepărtat de o endonuclează, *RNaza H*, care degradează specific ARN din hibridii ARN—ADN. Final, breșele rămase sînt „plombate” de ADN pol I, care adaugă nucleotidele complementare, pentru ca ADN ligaza să restabilească, în cele din urmă, continuitatea normală a moleculei. Procesul de formare a ARN „primer” se repetă pentru fiecare fragment Okazaki, probabil sub acțiunea unor ARN polimeraze diferite de cele care au produs inițierea replicării.

Structura și enzimologia bifurcației de replicare. Separarea celor două catene ale ADN la nivelul originii replicării are drept rezultat apariția unei bifurcații de replicare („replication fork”) sau punctul de creștere a ADN. Ea corespunde regiunii cel mai recent replicate și marchează zona de înaintare a replicării pe cromosom. Poate avea forma literei grecești theta (θ), în cazul cromosomilor circulari, forma de „ochi” sau de y, în cazul moleculelor de ADN lineare, forma literei sigma (σ) sau de lasou, în cazul replicării prin mecanismul cercului rotativ, și forma unei bucle de deplasare („displacement (D) loop”) (fig. 100), cînd sinteza ADN are loc unidirecțional, într-un cromosom circular sau linear (Kornberg, 1980).

Bifurcația de replicare este o regiune cu asimetrie chimică datorită polarității diferite a celor două catene. Natura lor antiparalelă face ca

una din catene să aibă o extremitate 3'—OH, iar cealaltă, una 5'—P. Or, după cum se știe, nici o ADN polimerază nu poate acționa pe extremitățile 5'. Soluția acestei probleme a fost dată de Gilbert (1965), care a sugerat că în cursul replicării ADN d.c., catenele terminate 3'—OH ar fi



sintetizate în mod continuu, în timp ce cele terminate 5' ar putea fi replicate prin sinteză discontinuă, utilizând un mecanism de tipul „back and fill”. În ansamblu deci, replicarea ar fi, în cea mai mare parte, semi-discontinuu (Kornberg, 1980).

„Deschiderea” ADN d.c. necesară pentru replicare este precedată de o derulare a celor două catene, cu ajutorul enzimelor de derulare („DNA unwinding enzymes”) sau ADN helicazele. Acestea derulează dubla elice de ADN parental, prin ruperea legăturilor de H intercatenare. Derularea cu consum de ATP pune însă probleme topologice speciale, legate de crearea unor constrângeri dincolo de locul de separare a celor două catene, prin apariția unor proceese de suprarăsucire din ce în ce mai pronunțate. Pe măsură ce înaintarea bifurcației progresează, dincolo de un anumit grad, aceste supertorsiuni pot bloca replicarea. De aceea, ele sunt suprimate prin intervenția unor enzime care modifică topologia ADN. Astfel, ADN giraza *E. coli* (Gellert, 1975), care introduce torsiuni suplimentare negative ale dublei helice, în sens contrar celor create de înaintarea bifurcației, compensează în avans constrângerile impuse de derularea celor două catene. O altă familie de enzime, *topoizomerazele de tip I* relaxează constrângerile structurale, printr-un mecanism diferit. Ele sunt endonucleaze care fac incizii m.c. în ADN superhelical, realizând detorsadarea, pentru ca prin activitatea lor ligazică („nicking-closing enzyme”) continuitatea ADN să fie refăcută, după ce condiția superhelicală a dispărut.

In vivo, prin acțiunea conjugată a girazei și topoizomerazei I se ajunge la un echilibru, care asigură buna funcționare a celulei. Dovada o constituie faptul că blocarea activității girazei cu acid nalidixic sau cu alt antibiotic specific, inhibă creșterea și multiplicarea bacteriilor.

În sfârșit, un rol important revine proteinelor de destabilizare („helix destabilizing protein”) numite și proteine de legare a ADN („DNA binding protein”) sau proteine de derulare („unwinding protein”) ca proteinele genei 32 de la fagul T4 sau „unwinding protein” a *E. coli*. Ele destabilizează dubla helice și se leagă apoi puternic de ADN m.c. astfel creat menținându-l în poziție adecvată pentru replicare (fig. 101).

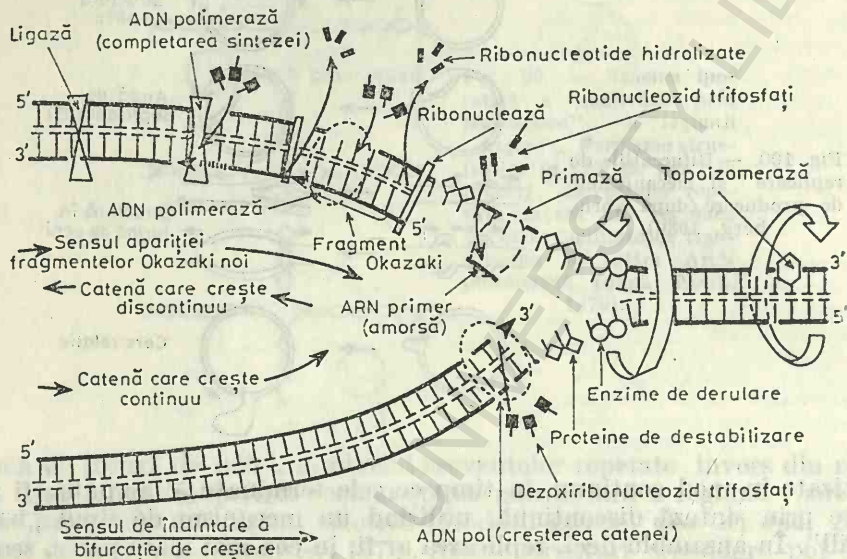


Fig. 101. — Biochimia bifurcației de replicare (după Berkaloff, 1981)

Creșterea moleculei de ADN. După „deschiderea” moleculei de ADN d.c. și formarea bifurcației de replicare, datorită caracterului antiparalel al celor două catene, creșterea („elongation”) moleculei de ADN are un caracter special, întrucât ADN polimeraza nu poate copia imediat, în mod continuu, decît una din catene — *catena în avans* — („leading chain”) și anume pe cea avînd orientarea $3' \rightarrow 5'$, prin adîția de dezoxiribonucleotide la capătul $3'$ al ARN „primer”. Replicarea celeilalte catene trebuie făcută în sens invers față de direcția de înaintare a bifurcației de replicare și în consecință în mod discontinuu. De aceea, o altă moleculă de ADN polimerază trebuie să aștepte ca bifurcația să fie suficient de avansată înainte de a-și începe activitatea în sens opus (fig. 102).

Sinteza noii catene, complementară catenei matrice orientată în direcția $5' \rightarrow 3'$ se face deci discontinuu și în întîrziere față de catena „leading”. De aceea, ea este numită *catena în întîrziere* („lagging chain”). Acest mod de creștere, determină exigențe enzimatice diferite. La *E. coli*, spre exemplu, creșterea catenei în avans necesită numai prezența ADN polimerazei și a factorilor de creștere. Catena „în întîrziere” are nevoie, în plus, de enzimele de amorsare pentru fiecare fragment de ADN sintetizat, de enzimele hidrolitice necesare pentru îndepărtarea ARN „primer”, de sisteme enzimatice pentru reparația breșelor și pentru legarea fragmentelor și restabilirea continuității catenelor.

Fragmentele Okazaki. Descoperirea fragmentelor Okazaki a fost determinată de observația că multe din nucleotidele marcate cu timidină tritiată, recent încorporate, nu se regăseseră inițial în molecule mari, ci ca părți componente ale unor scurte fragmente polinucleotidice (Okazaki

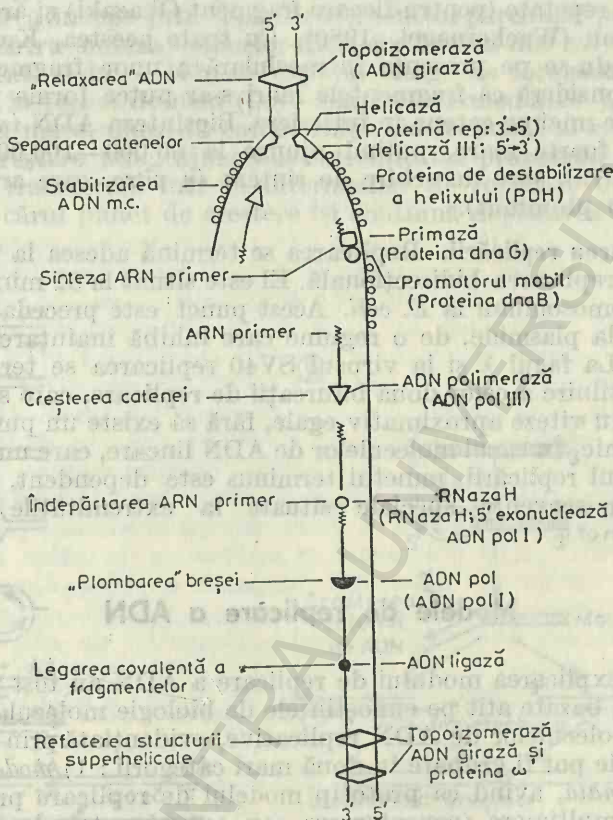


Fig. 102. — Proteinele implicate în replicarea ADN d.c. și funcțiile lor. Pentru simplificare este reprezentată în detaliu numai sinteza catenei „în întârziere”, care are loc în sens opus direcției de deplasare a bifurcației de replicare. În dreapta sînt menționate denumirile generale ale proteinelor și enzimelor, iar în paranteză ale celor identificate la *E. coli*; funcțiile lor sînt indicate în stînga (după Wackernagel, 1980).

și Okazaki, 1968). Această descoperire a fost confirmată de acumularea lor în celulele de *E. coli* deficitare în ADN ligază. La bacterii și fagi, fragmentele Okazaki sînt lungi de 1 000—2 000 nucleotide (8—10 S), în timp ce la eucariote sînt mult mai mici (100—200 nucleotide, respectiv 4 S). Ele sînt sintetizate în direcția $5' \rightarrow 3'$, utilizînd un ARN „primer”. Final, fragmentele Okazaki sînt legate într-un lanț continuu, prin trei reacții enzimatice succesive: 1) excizia ARN „primer” de RNază, acționînd de la extremitatea $5'$ a amorsei; 2) „umplerea” „locului liber creat prin excizia ARN „primer” și alungirea fragmentelor Okazaki de o ADN polimerază,

diferită de cea care le-a sintetizat; 3) legarea de către ADN ligază a ultimului nucleotid al unui fragment, cu primul nucleotid al fragmentului următor și restabilirea continuității ADN.

Majoritatea autorilor sînt de acord că, în principiu, sinteza catenei în avans poate fi continuă, în timp ce formarea catenei în întîrziere necesită reinițieri repetate (pentru fiecare fragment Okazaki) și are deci caracter discontinuu (Wackernagel, 1980). Cu toate acestea, Kwok și colab. (1979), bazîndu-se pe prezența intracelulară a unor fragmente Okazaki asimetrice, consideră că fragmentele mari s-ar putea forma pe catena în avans, iar cele mici pe catena în întîrziere. Biosinteza ADN *in vivo* are loc cu o viteză foarte mare, putînd ajunge la 60 000–100 000 pb/minut (Johnston, 1979), spre deosebire de sinteza *in vitro*, care are loc foarte lent ($\sim 1\,000$ pb/minut).

Terminarea replicării. Replicarea se termină adesea la un punct fix (terminus) în replicarea bidirecțională. El este situat la 32 minute pe harta genetică a cromosomului la *E. coli*. Acest punct este precedat, la *E. coli*, *B. subtilis* și la plasmide, de o regiune care inhibă înaintarea bifurcației de replicare. La fagul λ și la virusul SV40 replicarea se termină simplu la locul de întîlnire a celor două bifurcații de replicare, care se deplasează de la origine cu viteze aproximativ egale, fără să existe un punct terminus obligatoriu, unic. În cazul moleculelor de ADN lineare, care nu se circularizează în timpul replicării, punctul terminus este dependent, probabil, de prezența unor secvențe speciale situate la extremitățile duplexului.

Modele de replicare a ADN

Pentru explicarea modului de replicare a ADN au fost propuse mai multe modele, bazate atît pe cunoștințele de biologie moleculară, cît și pe arhitectura moleculelor de ADN replicative, evidențiată prin microscopie electronică. Ele pot fi grupate în două mari categorii: 1) *modelele de replicare bidirecțională*, avînd ca prototip modelul de replicare prin formarea de molecule multimerice (concatemere sau concatenate), la fagul T7 și modelul lui Cairns, descris la cromosomul bacterian și la fagul λ ; 2) *modelele de replicare unidirecțională*, cu cîteva variante distincte, ca modelul cercului rotativ (la fagul T4 și în transferul prin conjugare a plasmidelor și cromosomului bacterian) și modelul de replicare prin deplasare, descris la adenovirusuri, parvovirusuri și la ADN mitocondrial. Există și cazuri particulare, în care replicarea începe după un model și se termină după altul. Astfel, fagul T4 se replică inițial prin concatemere, iar fagul λ după modelul Cairns. La sfîrșitul ciclului însă, în ambele cazuri, apar aspecte caracteristice „cercului rotativ”.

Modelul de replicare prin formarea de molecule multimerice

Acest model de replicare bidirecțională este aplicabil moleculelor de ADN care rămîn lineare în tot cursul replicării. El se bazează pe observația că, la cele mai multe sisteme fagice, ADN replicativ, intracelular, este izolat sub forma unor structuri lungi, de cîteva ori mai mari decît

genomul infectant. Ele constau din genomuri repetate în, „tandem”, formînd structuri multimerice (concatenate sau concatemere). Microscopia electronică a permis stabilirea secvențelor acestui proces, evidențiînd diferitele aspecte ale unor cromosomi replicativi. Fagul T 7 are un genom ADN d.e. lung de $\sim 40\,000$ pb (~ 25 de gene).

Replicarea începe prin separarea catenelor parentale pentru a servi ca matrită pentru sinteza catenelor-fiice, nu la una din extremități, cum era de așteptat, ci la $\sim 17\%$ de capătul stîng. Se formează o structură intermediară în formă de ochi („eye shaped intermediates”), care devine progresiv mai mare, datorită caracterului bidirecțional al replicării. Cînd punctul de creștere stîng ajunge la extremitatea proximală a genomului, molecula se transformă într-un intermediar de replicare în formă de Y (fig. 103), al cărui punct de creștere își continuă deplasarea spre extremitatea dreaptă a genomului.

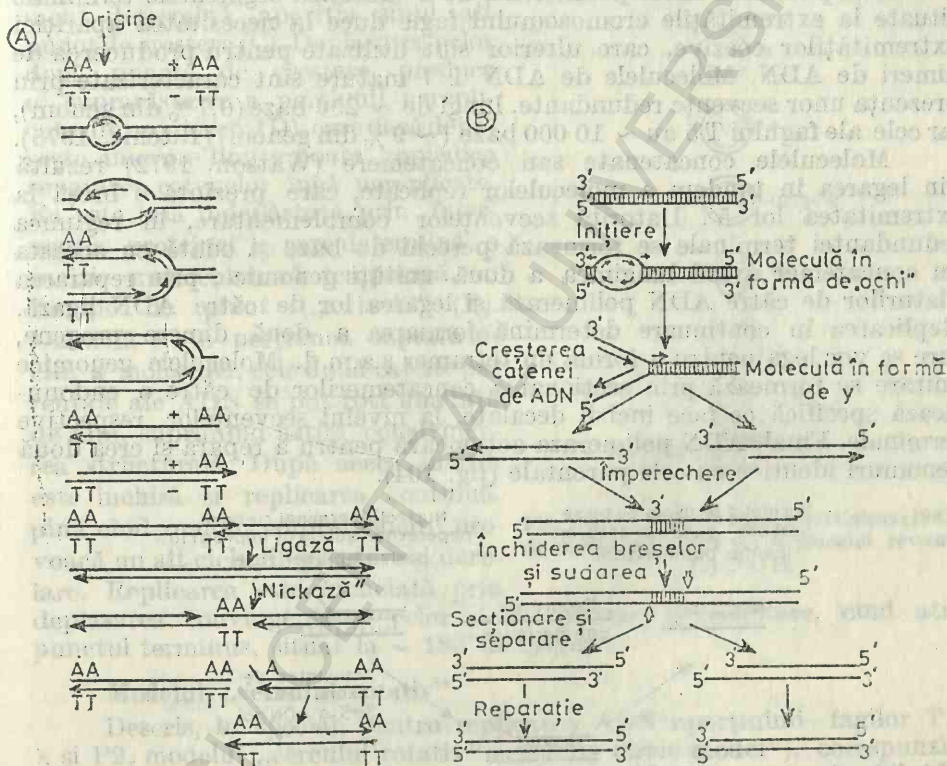


Fig. 103. — Replicarea ADN linear. A. Incapacitatea de a sintetiza fragmente de ADN la fiecare extremitate a cromosomului duce la apariția de extremități coezive, care apoi sînt utilizate pentru formarea unui dimer de ADN. Replicarea este completată prin închiderea catenelor de ADN, urmată de o incizie într-un situs diferit și sinteză reparatorie (după Dresler, 1980). B. Replicarea genomului fagice T 7, cu formarea inițială a unor molecule în formă de „ochi”, apoi în Y, ilustrează un caz particular al modelului general prezentat în A (după Girard și Hirth, 1980).

tatea dreaptă a genomului. Frecvent, începe o a doua rundă de replicare înainte ca prima să fie terminată, fapt care explică apariția unui al doilea

„ochi”. Observarea celor două tipuri de structuri („ochi” și „y”) exclude ideea unei derulări totale a catenelor, urmată de funcționarea lor ca matriță.

Microscopia electronică a evidențiat numai urme de regiuni monocatenare, ceea ce pledează pentru sinteza catenelor-fiice imediat după ce cele parentale se separă. După Wackernagel (1980), la fiecare punct de creștere s-ar găsi ~ 200 de molecule de proteine de derulare, fiecare legate de 8–10 nucleotide. Deci, fiecare bifurcație de replicare ar avea $\sim 2\,000$ de baze desperecheate, pe care se va iniția sinteza unor segmente de ADN. Cele mai multe date arată că la nivelul punctului de creștere numai una din catene (care permite creșterea în direcția 5' \rightarrow 3') este alungită continuu, cealaltă fiind sintetizată discontinuu, ca fragmente Okazaki, utilizând o amorsă ARN.

Formarea moleculelor concatenate

Incapacitatea ADN polimerazei de a sintetiza segmentele terminale situate la extremitățile cromosomului facic duce la necesitatea apariției extremităților coezive, care ulterior sînt utilizate pentru producerea de dimeri de ADN. Moleculele de ADN T 7 mature sînt caracterizate prin prezența unor secvențe redundante, lungi de ~ 250 baze (0,7% din genom), iar cele ale fagului T 5 au $\sim 10\,000$ baze ($\sim 9\%$ din genom) (Ritchie, 1975).

Moleculele concatenate sau concatemere (Watson, 1972) rezultă din legarea în tandem a moleculelor replicate, care prezintă o breșă la extremitatea lor 5'. Datorită secvențelor complementare, în regiunea redundanței terminale se formează perechi de baze și odată cu aceasta un concatemer avînd lungimea a două unități genomice, prin repararea hiaturilor de către ADN polimerază și legarea lor de către ADN ligază. Replicarea în continuare determină formarea a două dimere progene, care se vor lega pentru a forma un tetramer ș.a.m.d. Moleculele genomice unitare se formează prin secționarea concatemerilor de către o endonuclează specifică ce face incizii decalate, la nivelul secvențelor respective terminale. Final, ADN polimeraza acționează pentru a repara și crea două genomuri identice cu cele parentale (fig. 104).

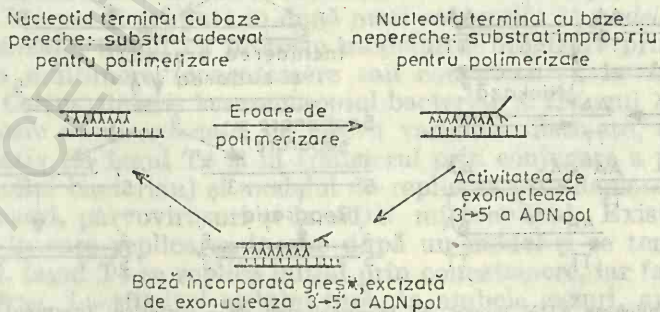


Fig. 104. — Funcția de corectare („proof-reading”) a ADN pol I' *E. coli* și a polimerazei fagului T 4 (după Johnston și colab., 1979).

Modelul lui Cairns

Autoradiogramele ADN marcat cu tritiu, provenind din culturi de *E. coli* care se divid rapid, au evidențiat, pelingă numeroase fragmente de ADN, și un cromosom intact, pe jumătate replicat. Menținerea topo-

giei circulare ridică o serie de probleme în cursul replicării; în modelul său original, Cairns a presupus existența unui pivot-motor („swivel-motor”), implicat în detorsionarea și separarea catenelor pentru o replicare bidirecțională.

Modul de replicare bidirecțională a fost confirmat de Ogawa și colab. (1968), la fagul λ , și de Wolfson și Dressler (1975), cu ajutorul microelectro-nografilor. Pe baza lor, a fost elaborat un model Cairns de replicare bidirecțională revizuit (fig. 105), în conformitate cu care molecula de ADN d.c. circulară închisă covalent (A) suferă o denaturare la un situs specific (originea), urmată de inițierea sintezei unui fragment de ADN (B). Ulterior, inițierea sintezei unui al doilea fragment determină apariția unui alt punct de creștere (C). Deplasarea celor două puncte de creștere produce o suprarăsucire a porțiunii nerePLICATE din cromosom (D), care dacă depășește anumite limite poate împiedica separarea catenelor încă nerePLICATE. Ea este însă îndepărtată prin intervenția proteinei ω , care determină o incizie monocatenară temporară, cu funcție de pivot („swivel”) (E). Datorită ei, în porțiunea suprarăsucită a moleculei, cele două catene parentale ale ADN se pot roti una față de alta, suprimând astfel constrângerea structurală. După aceea, incizia este închisă și replicarea continuă, până când o nouă suprarăsucire provoacă un alt ciclu de pivotare și derulare. Replicarea este încheiată prin deplasarea convergentă a celor două puncte de creștere, când ating punctul terminus, situat la $\sim 180^\circ$ de origine.

Modelul „cercului rotativ”

Descriș, în special, pentru replicarea ADN aparținind fagilor T 4, λ și P2, modelul „cercului rotativ” („rolling circle model”), corespunzând modului cel mai răspândit de replicare unidirecțională, este aplicabil ADN viral, precum și transferului asociat cu replicarea cromosomului bacterian și a plasmidelor în cursul conjugării.

În cazul fagului T 4, imediat după infectarea celulei bacteriene, are loc circularizarea ADN, datorită extremităților sale adezive redundante. Spre deosebire de modelul Cairns, în care ambele catene parentale rămân intacte, în modelul cercului rotativ catena $\ll - \gg$ rămâne un cerc închis, în timp ce catena $\ll + \gg$ suferă o incizie sub acțiunea unei endonucleaze (nickaza), care, după ce recunoaște o secvență anumită, creează o catenă

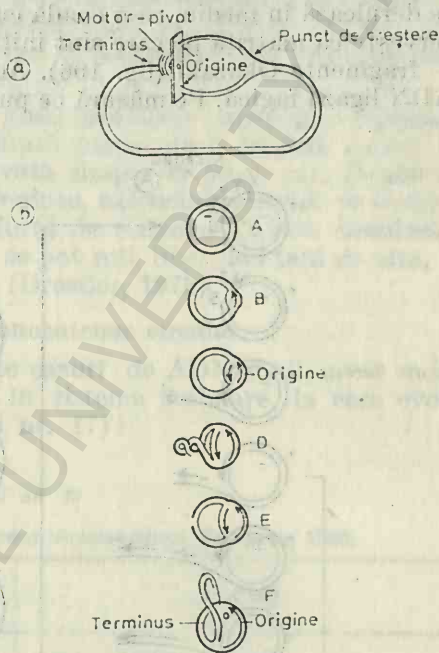


Fig. 105. — Modelul tradițional Cairns (1963) de replicare a ADN (a) și modelul revizuit (b) (1977).

lineară cu două extremități libere, una cu o grupare liberă 3'—OH, iar cealaltă cu o grupare liberă 5'—fosfat. Sinteza ADN începe prin legarea de nucleotide noi la capătul liber 3'—OH al catenei deschise, care servește ca „primer” pentru condensarea nucleozid trifosfaților de o ADN polimerază.

Una din particularitățile modelului este utilizarea matriței însăși ca „primer” pentru inițierea replicării. În plus, prin acest proces, catena respectivă se alungește continuu și simultan cu aceasta celălalt capăt 5' se derulează în mediu, ca o coadă cu lungime crescândă, care, la rindul său, servește ca matriță pe care sînt inițiate *de novo* — prin sinteză discontinuă — fragmente Okazaki (fig. 106). Aceste fragmente sînt reunite final de o ADN ligază fagică. Pe măsură ce punctul de creștere se deplasează în jurul

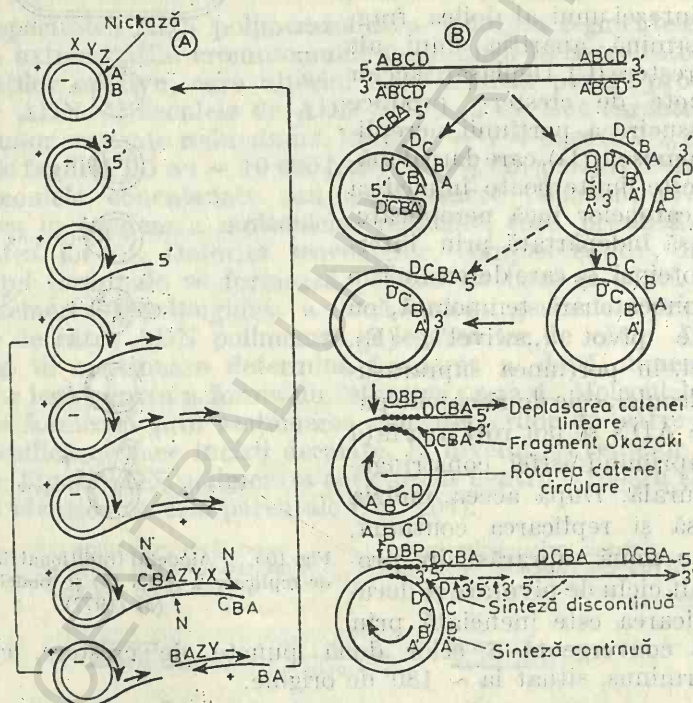


Fig. 106. — A. Replicarea ADN după modelul cercului rotativ (după Dressler, 1975). B. Evoluția procesului la furcul T 4 (după Girard și Hirth, 1980); DBP — proteine de legare a ADN.

catenei circulare «—», pentru a doua oară, „coada” 5' devine tot mai lungă decît genomul, fiind formată din secvențe genomice succesive (în tandem), din care ulterior pot fi eliberate moleculele genomice lineare, dotate cu capacitatea de circularizare și de inițiere a unor cicluri noi de replicare.

Denumirea de cerc rotativ vine de la faptul că replicarea are loc ca și cum catena matriță circulară s-ar roti în jurul unui ax ipotetic, permițînd creșterea continuă a extremității sale 3'—OH și derularea con-

comitentă a capătului 5'. În favoarea acestui model au fost aduse o serie de argumente legate de proprietățile structurale ale intermediarului replicativ. Astfel, după cultivare în prezența timidinei tritiate, una din catene $\ll + \gg$ apare mult mai lungă decât genomul matur (ceea ce corespunde unei viteze de sedimentare mai mari și unei densități mai mari în gradient de CsCl). Cealaltă catenă $\ll - \gg$ este menținută în forma unei matrice circulare m.c., închise covalent. Microscopia electronică a confirmat aceste date, evidențiind prezența unor structuri circulare avind o circumferință egală cu cea a genomului, din care iese o coadă de ADN d.c. a cărei lungime poate depăși de câteva ori pe cea a genomului. Ea va forma prin elivare genomurile individuale.

Modelul cercului rotativ nu pune probleme topologice speciale, deoarece forma circulară este menținută numai de o singură catenă intactă. Problema pivotării este rezolvată simplu în acest caz. Pe măsură ce punctul de creștere se deplasează înainte, catenele parentale se despiralează, fără a genera și transmite o forță de torsiune. Catenă circulară și „coadă” intermediarului de replicare se pot roti liber una față de alta, iar punctul de creștere servește ca pivot (Dressler, 1975).

Modelul de replicare a ADN monocatenar circular

Descris la fagii fd, M13 și în alte cazuri de ADN viral, acest model a fost studiat la fagul $\Phi X174$ *in vitro*, în sisteme acelulare, la care evoluează în trei stadii succesive (tabelul nr. 17):

Tabelul nr. 17

Ciclu de replicare al ADN monocatenar circular (după Kornberg, 1980)

Etapete		Durata (min. la 33°C)	Procese
I.	Producerea formelor replicative (ADN m.c. \rightarrow FR)	0—1	Adsorbție, pătrundere în celule ADN viral m.c. \rightarrow FR parentală Transcrierea FR
II.	Replicarea formelor replicative (FR \rightarrow FR)	1—20 25	FR parentală \rightarrow ~60 FR progene Stoparea replicării FR Stoparea sintezei ADN-gazdă
III.	Sinteza ADN m.c. viral (FR \rightarrow ADN m.c.)	20—30 40	35 cercuri rotative \rightarrow ~ 500 genomuri virale m.c. Încapsidare Liza celulelor bacteriene

1) *Conversia genomului ADN m.c. circular* într-o moleculă dublu catenară — forma replicativă de tip II (FRII) — sub acțiunea unui sistem de inițiere multienzimatic, conținând ADN polimeraza III bacteriană, în prezența unor factori proteici bacterieni, a ATP și a celor patru nucleotide. Inițierea sintezei catenei complementare ar avea loc, probabil, la situsuri multiple, în prezența ARN „primer”, la nivelul unor secvențe în „ac de păr”, încă ipotetice (Gros și Hirth, 1980). Datorită acestui mecanism,

catena $\llcorner - \gg$ nou sintetizată din structura FR II conține mai multe breșe, care sînt închise de ADN polimeraza I și ADN ligază. Ulterior, ADN giraza transformă FR II într-o formă replicativă de tipul I (FR I), dublu catenară circulară închisă covalent.

2) *Replicarea FR*. În faza următoare, formele replicative parentale sînt replicate semiconservativ, prin mecanismul cercului rotativ, pentru a produce forme replicative progene. Acest proces este condiționat de participarea unei proteine fagice specifice, proteina genei A (pg A), care acționează ca un factor de inițiere. Ea produce o incizie m.c. la un punct specific (originea replicării), retransformînd FR I în FR II. Proteina pg A (~60 kdal) fagică se fixează pe extremitatea 5' a catenei $\llcorner - \gg$ incizate, în timp ce extremitatea 3'-OH, creată de ea, servește ca amor-să, pentru sinteza de noi catene $\llcorner + \gg$. Replicarea FR II este catalizată de ADN pol. III și de prezența proteinei *rep* bacteriene, care este o ADN helicază, capabilă să deruleze ADN dublu catenar, utilizînd energia din ATP. Cînd s-au acumulat ~60 FR progene replicarea acestora încetează.

3) *Sinteza ADN viral m.c.* se realizează prin mecanismul de replicare prin deplasare, în care participă cel puțin 7 proteine virale și mai multe proteine bacteriene, între care proteina *rep*, proteinele de legare a ADN (DBP) și ADN pol III. Replicarea se face după modelul cercului rotativ asimetric (fig. 107). Refacerea structurilor de ADN d.c. este împiedicată de DBP („DNA binding protein”) și de anumite proteine fagice. Rezultă

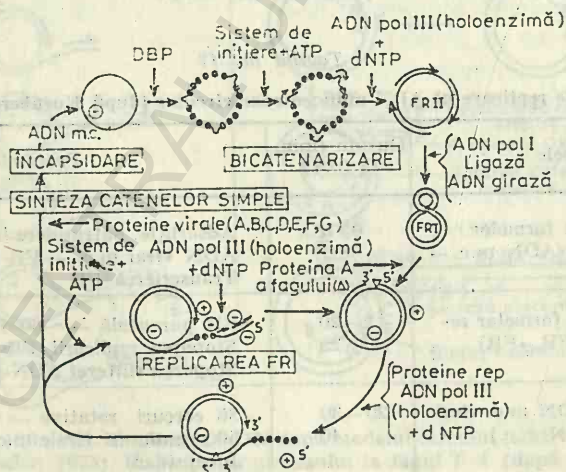


Fig. 107. — Schema etapelor de replicare a ADN la fagul Φ X174.

o moleculă de ADN viral m.c. poligenomic (concatemeră), care este secționată la lungimea genomului normal, probabil de pg A. Moleculele produse sînt încapsidate și se circularizează printr-un mecanism încă necunoscut.

Modelul de replicare prin deplasare

Aplicabil ADN mitocondrial (circular) și unor genomuri virale li-neare (adenovirus, parvovirus), acest model are drept caracteristică principală asimetria completă de replicare a celor două brațe ale bifurcației

de replicare : numai unul din brațe se replică, celălalt rămânând permanent monocatenar. În cazul moleculelor de ADN circulare, replicarea prin deplasare creează o buclă de deplasare m.c. [Bucla D „displacement loop”], iar pe ADN linear formează structuri în formă de y, avînd unul din brațe monocatenar.

Replicarea ADN la Adenovirus. Genomul adenovirusurilor, izolat în formă circulară, este în realitate reprezentat de o moleculă de ADN d.c. lineară. Circularizarea este determinată de doi factori : 1) prezența la extremitatea 5' a celor două catene a unor molecule de „proteine de circularizare” (~ 55 000 dal), legate covalent de ADN și interacționînd între ele, și 2) existența unor secvențe complementare repetate invers (lungi de 40—600 nucleotide), la extremitățile ambelor catene. Ele permit circulari-

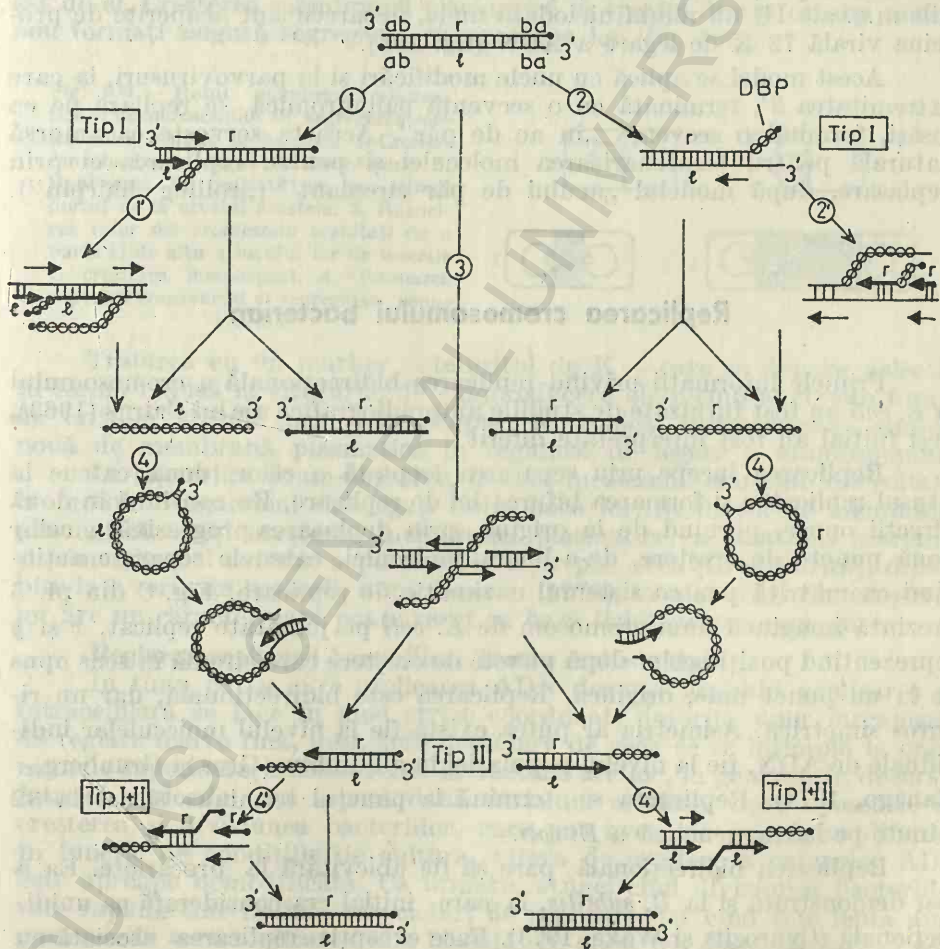


Fig. 108. — Replicarea ADN la adenovirusuri, după modelul „deplasarea sintezei” (după Girard și Hirth, 1980).

zarea moleculelor monocatenare, care iau forma de tigare (engl. „pan-handle”). Experimental s-a demonstrat că proteinele de circularizare au un rol important în infecțiozitate, în replicare și în încapsidare.

Replicarea începe în mod aleatoriu, fie pe una din catene, fie pe cealaltă (fig. 108, 1, 2), la extremitățile moleculei sau mai rar (3) la ambele extremități concomitent. Replicarea are loc numai pe una din catenele parentale, în timp ce cealaltă este deplasată de ADN nou sintetizat. În felul acesta, se pot produce succesiv pe aceeași moleculă mai multe bifurcații (1', 2'). La sfârșitul acestei prime etape rezultă o moleculă-fică d.c. și una sau mai multe molecule m.c., care devin bicatenare ulterior, probabil după circularizare (4). Intermediarii de replicare (IR) la *Adenovirus* sînt fie molecule d.c. ramificate, cu unul sau mai multe brațe m.c. (tipul I), fie molecule lineare neramificate, în parte monocatenare (tipul II), fie cu un aspect intermediar (tipul I și II) (Girard și Hirth, 1980). Regiunile m.c. ale IR nu rămîn niciodată nude, deoarece sînt acoperite de proteina virală 72 K de legare a ADN (fig. 108).

Acest model se aplică cu unele modificări și la parvovirusuri, la care extremitatea 3', terminată cu o secvență palindromică se repliază pe ea însăși, formînd o secvență „în ac de păr”. Aceasta servește ca amorsă naturală pentru bicatenarizarea moleculei și pentru replicarea ei prin deplasare, după modelul „acului de păr circulant” („rolling hairpin”).

Replicarea cromosomului bacterian

Primele informații privind replicarea bidirecțională a cromosomului la *E. coli* au fost furnizate de studiile autoradiografice ale lui Cairns (1963), deși inițial au fost interpretate diferit.

Replicarea începe prin separarea treptată a celor două catene la situsul replicator și formarea bifurcației de replicare. Ea continuă în două direcții opuse, pornind de la origine, prin deplasarea progresivă a celor două puncte de creștere, de-a lungul moleculei, catenele separate acționînd ca matrită pentru sistemul enzimatic de replicare. Fig. C din pl. 5 prezintă imaginea unui cromosom de *E. coli* pe jumătate replicat, x și y reprezentînd poziția celor două puncte de creștere care circulă în sens opus de la un punct unic, originea. Replicarea este bidirecțională, dar nu riguros simetrică. Asimetria ar putea exista fie la nivelul moleculelor individuale de ADN, fie la nivelul populației în ansamblu (Gros și Grunberg—Manago, 1974). Replicarea se termină la punctul terminus situat la 32 minute pe harta genetică a *E. coli*.

Replicarea bidirecțională pare să fie ubicvitară la procariote. Ea a fost demonstrată și la *B. subtilis*, la care inițial era considerată ca unidirecțională (Cyurosits și Wake, 1973). Face excepție replicarea asociată cu transferul cromosomului și plasmidelor, în cursul conjugării bacteriene, care se realizează unidirecțional (Ritchie, 1975).

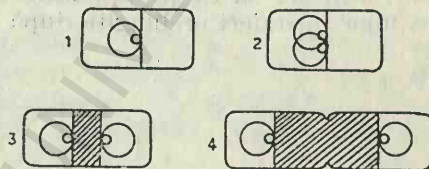
Segregarea materialului genetic după replicare *

Relația obligatorie dintre sinteza de ADN și diviziunea celulară asigură ca diviziunea să aibă loc numai în momentul în care celula-mamă conține doi cromosomi, în așa fel încît după segregare, fiecare din cele două celule-surori să conțină o copie exactă a genomului celulei parentale.

Jacob (1966), precum și Ryter și colab. (1968) au descris la *B. subtilis* inserția mezosomală a cromosomului și importanța depunerii de material nou de membrană plasmatică în regiunea ecuatorială a celulei, pentru segregarea materialului genetic.

La bacteriile Gram-pozitive care se divid s-a demonstrat, pe secțiuni în serie, atât legătura directă dintre mezosomi și cromosomi, cît și faptul că în momentul diviziunii mezosomii se dublează și se deplasează lateral spre regiunile polare ale celulei, antrenînd, fiecare, cite un cromosom atașat de el. Creșterea membranei plasmatice în spațiul dintre cei doi nucleii nou formați asigură segregarea și separarea lor (fig. 109).

Fig. 109. — Rolul membranei plasmatice și al mezosomilor în segregarea materialului genetic la bacterii. 1. Cromosom bacterian legat de membrană. 2. Replicarea lui inițiată de un stimul pornit de la nivelul acesteia. 3. Răsucirea celor doi cromosomi rezultați de o parte și de alta a locului lor de inserție și creșterea membranei. 4. Formarea septului transversal și segregarea genomurilor.



Tratarea cu un marker — teluritul de K — care se depune selectiv în formă redusă la situsurile de oxidoreducere ale membranei, sub formă de cristale vizibile prin microscopie electronică, demonstrează sinteza nouă de membrană plasmatică în regiunea de legare a cromosomului.

La bacteriile Gram-negative, la care mezosomii sînt slab dezvoltati, cromosomii bacterieni sînt legați fie la baza lor, fie direct de membrana plasmatică. Deși creșterea membranei plasmatice, a stratului mureinic și a membranei externe a peretelui celular pot avea particularități deosebite la o serie de bacterii, după Davern (1979), în toate cazurile creșterea lor are un caracter care poate servi ca bază fizică pentru segregare.

Reglarea replicării bacteriilor. Teoria repliconului

În timp ce în *in vitro* replicarea ADN decurge anarhic, replicarea sa intracelulară se face în mod strict coordonat, datorită unor mecanisme de reglare foarte fină, deși, spre deosebire de ceea ce se întîmplă la organisme superioare, sinteza ADN la bacterii are loc, în general, în decursul întregii perioade care separă două diviziuni celulare. Spre deosebire de creșterea și diviziunea bacteriilor, care pot avea loc cu viteze diferite, în funcție de condițiile de cultură, viteza de creștere a catenelor ADN este aproape nemodificată. Ca urmare, atunci cînd diviziunea bacteriilor este rapidă, sînt inițiate noi cicluri de replicare, iar cînd este lentă apar perioade în care replicarea este blocată. În acest fel, masa celulară și con-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 341.

ținutul în cromosomi sînt permanent reglate. După Kornberg (1980), ca și în cazul altor căi biosintetice, în care rolul major în reglare revine punctului de angajare în calea respectivă, etapa decisivă în reglare este inițierea ciclului de replicare.

Helmstetter și colab. (1968, 1976) au arătat că timpul necesar pentru replicarea integrală a ADN cromosomal este invariabil, deoarece atât viteza sa de creștere, cit și durata segregării sînt relativ constante. La *E. coli*, la 37°C, durata unui ciclu complet de replicare este de ~ 40 minute. În schimb, timpul de dublare al masei celulare la o anumită tulpină poate varia în funcție de condițiile de mediu, între 22 și 220 minute, în timp ce durata replicării cromosomului este invariabilă de ~ 40 minute. De asemenea, timpul necesar pentru formarea septului transvers și pentru segregare în celulele-surori este, de asemenea, relativ fix (~ 20 min), la cele mai multe tulpini de *E. coli* la 37°C.

Elementul variabil major al ciclului este reprezentat de timpul necesar pentru a iniția noi cicluri de replicare (Kornberg, 1980). Experimental s-a demonstrat că există posibilitatea inițierii de noi cicluri, înainte ca acel anterior să fie pe jumătate efectuat, după cum există și posibilitatea unor întirzieri prelungite după ce celulele s-au divizat. Fig. 110 pre-

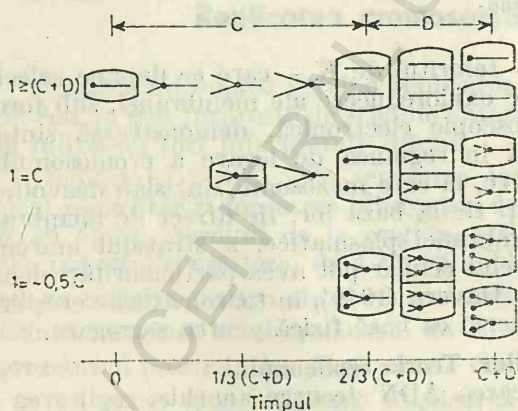
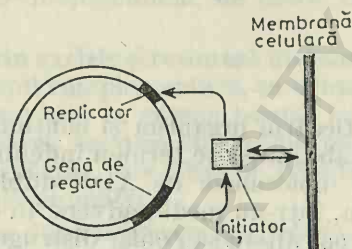


Fig. 110. — Evoluția replicării cromosomului bacterian și a diviziunii bacteriene în cursul ciclului celular, în funcție de intervalul de inițiere (I) sau de timpul dintre inițieri. C — durata de creștere a catenei; D — timpul de diviziune. Pentru simplificare, cromosomul circular este reprezentat în formă lineară. $I \geq (C + D)$ — masa celulară se dublează în două ore (rată de creștere lentă). Inițierea noilor replicări are loc după ce celulele-surori s-au separat; $I = C$ — masa celulară se dublează într-o oră (viteză de creștere moderată). Noile inițieri au loc cînd replicarea anterioară s-a terminat, dar înainte ca să înceapă diviziunea celulară. $I = \sim 0,5 C$ — masa celulară se dublează în 30 de min. (creștere rapidă). Noile inițieri au loc cînd ciclul de replicare anterior este numai pe jumătate terminat. Se formează cromosomi cu bifurcații multiple (după Helmstetter, 1968).

zintă sintetic mai multe modalități de evoluție, care demonstrează că inițierea replicării este un proces independent de diviziunea celulară, dar nu și invers. În general, se consideră că replicarea cromosomului trebuie să fie terminată pentru a declanșa diviziunea. Dar, după cum remarcă Kornberg, deși ciclurile de replicare și diviziune celulară sînt obișnuit sincronizate, este posibil ca să nu fie direct cuplate și să răspundă la semnale diferite.

Conceptul de replicon. Jacob și Brenner (1963) au dat denumirea de *replicon* oricărui element genetic (cromosom bacterian, genom fagie sau plasmidă), capabil de replicare autonomă. Orice asemenea unitate de replicare are aptitudinea de a determina intrarea în funcție a unui circuit de reglare specific, cu funcție de control genetic asupra replicării proprii sale structuri, în coordonare cu diviziunea celulară. Fiecare replicon are o regiune funcțională numită *replicator*, care controlează replicarea sa, și o genă al cărui produs difuzibil cu rol de reglare este numit *inițiator* (fig. 111).

Fig. 111. — Modelul lui Jacob și Brenner privitor la reglarea replicării la bacterii.



Replicatorul este o structură genetică specifică, nedifuzibilă, care, înserișă în secvența repliconului respectiv, este analogă funcțional genei „operator”, implicată în biosinteza proteinelor. El reprezintă un element structural care poate fi „recunoscut” de inițiatorul aceluiași replicon. Există și excepții, ca în cazul unor fagi ADN mici, a căror replicare este dependentă de aparatul de replicare al gazdei.

Inițiatorul ar produce derularea ADN la nivelul regiunii specifice (replicator sau origine). Dovada o constituie faptul că repliconii lipsiți de un replicator sau de o genă de reglare funcțională nu se pot replica independent, deoarece ADN nu se derulează local pentru a permite inițierea replicării. Substanțele proteice inițiator sînt instabile sau consumate în cursul inițierii. De aceea, dacă sinteza proteinelor este împiedicată, după ce inițierea s-a produs, replicarea va continua pînă la capăt, însă o nouă undă de replicare nu va începe decît dacă biosinteza proteinelor este restabilă. Inițierea unui nou ciclu de replicare este condiționată de o nouă sinteză de inițiator și de o nouă reacție de activare a replicatorului.

Prin analogie cu conceptul de replicon de la procariote, cromosomii eucariotelor pot fi subdivizați în *unități de replicare*, ce corespund unor regiuni ale ADN, avînd în medie 30 000—300 000 pb. (respectiv 10—100 μm ; Edenberg, 1975). Ele conțin o origine a replicării, de la care pleacă două bifurcații de replicare în direcții opuse, pînă cînd ating un punct terminal de creștere, corespunzînd locului de întîlnire a bifurcațiilor de replicare adiacente. Au fost descrise și unități de replicare foarte mici ($< 5 \mu\text{m}$) și foarte mari ($\sim 100\text{—}400 \mu\text{m}$) (Mechali, 1980).

Reparația genetică

„Capacitatea celulelor de a-și repara defectele din structura ADN poate fi un factor deosebit de important în evoluția biologică”

P. C. HANAWALT și R. H. HAYNES

Viața fiecărui organism și continuitatea lui de-a lungul generațiilor depind de stabilitatea pe termen îndelungat a informației genetice înscrisă în structura moleculelor de ADN dublu helical. Organismele vii trăiesc, foarte adesea, într-un mediu advers, în care o serie de factori nocivi, fizici sau chimici, pot altera sau chiar distruge materialul lor genetic. Numeroase fapte de observație au demonstrat că ADN este vulnerabil și chiar, în unele cazuri, manifestă o sensibilitate specială față de unii agenți din mediu, cum sint, spre exemplu, radiațiile UV sau unele substanțe chimice. Ca urmare, toate sistemele vii au dezvoltat în cursul evoluției lor o serie de mecanisme menite să asigure stabilitatea pe termen îndelungat a informației genetice, prin corectarea greșelilor și repararea defectelor din structura moleculelor de ADN (Howard-Flanders, 1981).

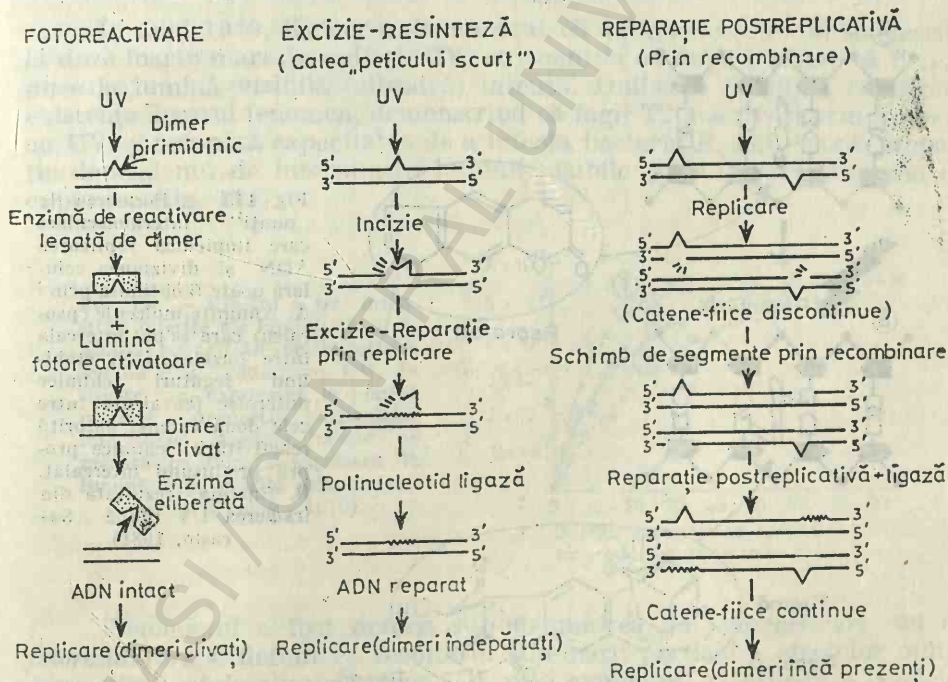
Arhitectura moleculară a ADN are anumite particularități care asigură stabilitatea materialului genetic, dar, în același timp, implică vulnerabilitatea față de agenții nocivi și capacitatea de a recunoaște și de a repara aceste leziuni. Astfel, după cum remarcă Stent (1971), forma dublu catenară, sub care este înscrisă informația genetică în molecula de ADN, reprezintă prin ea însăși o anumită redundanță, care are rolul de a crește enorm stabilitatea ADN, ca moleculă purtătoare de informație genetică. În același timp, această structură oferă posibilitatea ca ori de câte ori o catenă este lezată, cealaltă să servească nu numai pentru păstrarea informației, ci și pentru repararea leziunii. Lucrurile se petrec ca în tehnologia de construcție a mașinilor complexe sau a computerelor; în care principiul detectării și corectării erorilor, bazat pe componenți redundanți, are o importanță mai mare decât economia construcției (Stent, 1971). Importanța proceselor de reparație a materialului genetic rezultă și din faptul semnalat de Kornberg (1980) că ADN este singura macromoleculă ale cărei „leziuni” sau defecte pot fi corectate prin activitatea unor sisteme enzimactice ce au evoluat ad-hoc. În acest scop, celulele au dobândit de-a lungul evoluției lor o serie de strategii conceptual diferite, având mecanisme diverse și eficiență variată. Natura, reglarea și modul lor de desfășurare la nivel molecular sint cel mai bine cunoscute la bacteria *E. coli* (Walker, 1984), la care au fost cel mai mult studiate, fără a avea certitudinea — în etapa actuală — că pot fi extrapolate ca atare — la toate organismele vii.

Mecanismele de reparație genetică la bacterii

1) Mecanismele cele mai simple de reparație genetică se bazează pe reversia directă a leziunii, fără nevoia de a sintetiza noi legături fosfodiester. În această categorie intră: a) *fotoreactivarea*, care implică reversia dimerilor de pirimidină produși de expunerea la radiații UV la structura lor originară (fotomonomerizarea), sub acțiunea unei enzime fotoreactivatoare și b) *răspunsul reparator adaptativ*, cunoscut în special în cazul îndepărtării grupării metil de la O⁶-metilguanină, de către O⁶-alchilguanin-ADN transferază.

2) Mecanismul de reparație prin excizie și resinteză utilizează faptul că informația este prezentă în două copii complementare, ca urmare a naturii dublu catenare a ADN. Incizia efectuată în catena lezată, la nivelul sau lângă situsul leziunii, permite excizarea acesteia sub forma unui fragment din catena lezată. Segmentul îndepărtat este ulterior resintetizat, utilizând catena complementară normală ca matriță.

3) Reparația prin recombinare după replicare implică un interschimb de catene prin recombinare, ca un mecanism adaptat să repare lacunele sau hiaturile („gaps”) produse în catena-fiică după replicarea ADN lezat (fig. 112)



Dimer de pirimidină sau alt fotoprodus al iradierii UV

Fig. 112. — Căile majore de reparație enzimatică a leziunilor ADN induse de iradierea cu UV la *E. coli*. Cele trei mecanisme prezentate sînt, în principiu, fidele. Liniile groase — catene-fiice produse în prima replicare după iradiere; liniile subțiri — catene-parentale (iradiate cu UV); liniile ondulate — ADN polimerizat în cursul replicării reparatorii (schemă adaptată după Hanawalt și Witkin, 1976).

4) În ultimii ani a apărut ca evidentă existența la *E. coli* a unei rețele de reglare a genelor cu rol în reparația genetică, a cărei exprimare este *indusă* ca răspuns față de anumiți agenți care lezează ADN. Acest mecanism, avînd rolul de a repara leziunile ce nu pot fi corectate de sistemele constitutive descrise anterior, este efectuat de *sistemul reparator inductibil „SOS”*.

Leziunile ADN

Lezarea moleculelor de ADN poate fi produsă ca urmare a expunerii la acțiunea a diferiți agenți fizici sau chimici exogeni, a unor radicali liberi produși în cursul metabolismului, precum și în cursul replicării. Unele substanțe chimice induc modificări direct, în timp ce altele sînt active numai după ce au fost metabolizate în celulă. Astfel, spre exemplu, hidrocarburile ciclice, ca benzopirenul sînt inițial metabolizate la diol-epoxizi, care acționează asupra bazelor nucleice.

Leziunile ADN au o gamă foarte variată și ridică probleme speciale și uneori specifice pentru îndepărtarea lor. Radiațiile UV determină formarea de legături chimice puternice între două baze pirimidinice de pe aceeași catenă, dezorganizînd local molecula de ADN și producînd ruperea

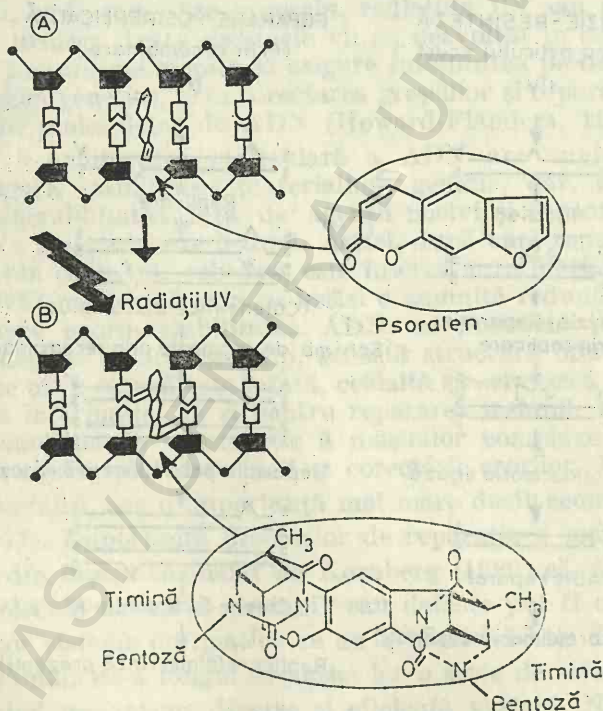


Fig. 113. — Formarea de „punți” intermoleculare care împiedică replicarea ADN și diviziunea celulară poate fi obținută prin : A. Anumite molecule (psoralen) care se pot intercala între bazele ADN, stabilind legături chimice puternice (covalente) între cele două catene, datorită reactivității chimice proprii produsului intercalat. B. Energia rezultată din iradierea UV (după Sarasin, 1981).

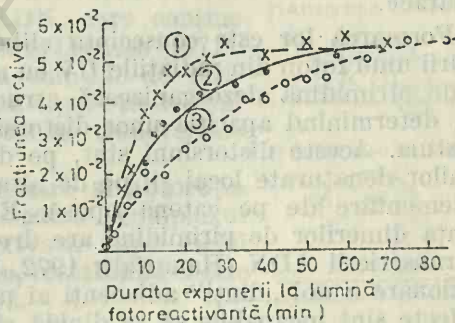
legăturilor slabe cu bazele complementare de pe catena opusă. Radiațiile X sau γ provoacă rupturi ale catenelor ADN, întrerupînd continuitatea matriței în replicare, în general, printr-un efect indirect, care implică participarea produșilor radiolizei apei (radicalii H^+ și OH^- , foarte reac-

tivi). În afara modificărilor uzuale de tipul delețiilor, inserțiilor, al incorporărilor de baze incorecte, consecutive erorilor de replicare sau unor deficiențe ale mecanismelor care asigură corectarea greșelilor („proof-reading”), au fost descrise și o serie de modificări mai complicate. Mitomicina C, agenții alchilanți bifuncționali, derivații psoralenului (produs natural de origine vegetală) se intercalează între bazele ADN și stabilesc legături încrucișate de tipul „punților” chimice, care leagă o bază de pe o catenă cu o altă bază de pe catena opusă (fig. 113). Aceste legături sînt fie consecința reactivității proprii a compușilor respectivi, fie a energiei adiționale furnizată de iradierea UV. Activitatea agenților din acest grup este înalt mutagenă și foarte toxică pentru celule. Datorită faptului că cele două catene sînt legate la același nivel, structura spațială a complexului și lipsa unei catene intacte care ar putea servi ca matriță nu permit reparația, fapt care duce la moartea celulei (Kornberg, 1980; Hélène, 1984).

Fotoreactivarea

În anul 1949, Kelner a demonstrat că actinomicetele din sol rezistă la doze foarte mari de radiații UV, cu condiția ca după iradiere să fie expuse la lumină vizibilă (albastră) intensă. Dulbecco (1949) a confirmat existența acestui fenomen, demonstrînd că fagii T2 inactivați prin iradiere cu UV își recapătă capacitatea de a infecta bacteria *E. coli*, într-o proporție dependentă de intensitatea luminii vizibile și de durata timpului de expunere (fig. 114).

Fig. 114. — Efectul a trei intensități diferite ale luminii (1, 2, 3) asupra capacității de infecție a fagului T2 iradiat cu UV. În fiecare caz, expunerea la lumină mărește proporția particulelor infecțioase. Aceasta crește pe măsură ce durata expunerii la lumină este mărită (după Dulbecco și colab., 1970).



Fenomenul a fost descris sub denumirea de *fotoreactivare* sau de *fotorestaurare* și definit ca rezultatul eliminării parțiale a efectelor mutagene și/sau letale ale radiațiilor UV, prin expunerea ulterioară a celulelor iradiate, la acțiunea unor radiații luminoase, cu lungime de undă de 330—450 nm. Ulterior, s-a demonstrat că iradierea UV produce o modificare lezională caracteristică, reprezentată de formarea unei legături chimice puternice, respectiv a unui dimer de tipul ciclobutil, intracatenar, între două pirimidine adiacente pe aceeași catenă (Hanawalt, 1967). Această modificare este cauza majoră a celor mai multe consecințe biologice ale

iradierii cu UV (Settlow, 1966), ca, de exemplu, a efectelor mutagene sau letale și în cazul unor organisme a efectelor cancerigene (Witkin, 1976). La nivel molecular, dimerii de pirimidină (fig. 115) se formează prin deschiderea legăturilor duble între atomii de C 5' și 6' a două pirimidine

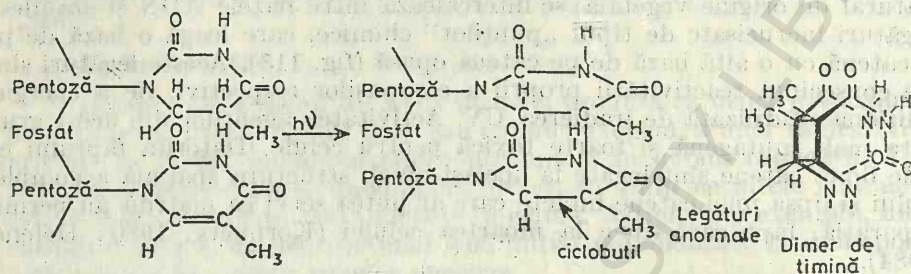


Fig. 115. — Structura dimerului ciclobutiltimină. Iradierea cu ultraviolete determină legarea resturilor de timină adiacente pe o catenă a ADN.

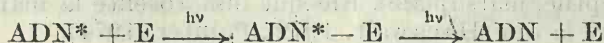
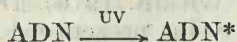
adiacente și prin formarea unui ciclu cu patru atomi de C (ciclobutan), care împinge cele două baze, determinând ruperea legăturilor de H cu bazele complementare de pe catena opusă. Cel mai adesea, se desfac încă două baze, legate de fiecare parte a dimerului. Dimerii de pirimidină se formează cel mai frecvent între două molecule de T (~ 50% din cazuri), ceva mai rar (~ 40%) între o moleculă de T și una de C și foarte rar (~ 10%) între două molecule de C. De aceea, cei mai mulți dimeri se vor forma în regiunile bogate în T și, ca o consecință, microorganismele al căror ADN este mai bogat în T vor fi mult mai sensibile la acțiunea UV decât cele sărace.

Formarea lor este consecința eliberării de energie, ca rezultat al întâlnirii unui foton din radiațiile UV cu molecula de ADN. Apariția dimerului de pirimidină dezorganizează structura normală dublu helicală a ADN, determinând apariția unor distorsiuni locale ale structurii spațiale a acestuia. Aceste distorsiuni sînt, pe de o parte, consecința existenței regiunilor denaturate local și, pe de alta, a ruperii legăturilor cu bazele complementare de pe catena opusă. Experimental s-a demonstrat că prezența dimerilor de pirimidină are drept consecință blocarea replicării și a transcrierii ADN (Hanawalt, 1972, 1975). Efectul este similar celui de fuzionare a doi „dinți” adiacenți ai unui fermoar. Bacteriile cu astfel de defecte sînt incapabile să se dividă și să formeze colonii.

Mecanismul molecular al fotoreactivării. Tulpinile sălbatice de *E. coli* sînt capabile să neutralizeze efectul potențial letal a ~ 1 000 de dimeri de pirimidine, utilizînd unul sau mai multe tipuri de procese de reparație enzimatică (Witkin, 1976).

Primul proces descris a fost cel de *fotoreactivare* sau *fotorestaurare*, care constă în fotomonomerizarea enzimatică, *in situ*, a dimerilor de pirimidină, cu ajutorul energiei fotonice furnizată de radiațiile UV cu lungime de undă (λ) mare sau al luminii vizibile cu λ scurtă. El se manifestă

în condiții optime după iluminarea cu lumină vizibilă (albastră) și ar evolua, după Kimball (1979), după următoarea schemă generală:



în care $\text{ADN}^* = \text{ADN}$ cu dimeri de pirimidină, iar $\text{E} =$ enzima de foto reactivare. În ultimii ani, au fost făcute progrese evidente (Hanawalt, 1972, 1973), care au lămurit unele aspecte la nivel molecular.

Enzima fotoreactivatoare sau *fotomonomerizantă* (fotoliaza) este la *E. coli* produsul genei structurale *phr* și are caracterul de enzimă constitutivă. Ea este prezentă la această bacterie, în mod normal, în cantitate de ~ 20 de molecule/celulă (Härm și Rupert, 1979). Bacteriile infectate cu un fag lambda, în genomul căruia a fost încorporată gena *phr*, produc o cantitate foarte mare de enzimă (Sutherland, Court și Chamberlin, 1972). Enzima fotoreactivatoare este capabilă să recunoască și să lege dimerii de pirimidină și la întuneric. Ea are însă nevoie absolută de lumină ($\lambda = 310\text{--}600$ nm) pentru a-i eliva sau monomeriza *in situ*. Purificată, enzima fotoreactivatoare a *E. coli* nu are funcție de cromofor. Ea este inactivă la întuneric și activată de lumină. Absorbția luminii este atribuită complexului specific, enzimă legată de ADN lezat E-ADN (Wun, Gih și Sutherland, 1977).

Procesul de fotoreactivare evoluează în trei etape succesive (fig. 116).

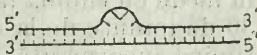
În prima etapă, enzima fotoreactivatoare recunoaște regiunea distorsionată a ADN, care conține dimerul de pirimidină. După Jagger și Ikenasa (1971), deși enzima este specifică pentru dimerii de pirimidină, ea se poate lega și de alte tipuri de leziuni mai rare, ca, de exemplu, legăturile transversale („adducts”) dintre pirimidine.

În faza a doua, după iluminare și absorbția energiei luminoase vizibile de către complexul enzimă-ADN lezat, enzima activată rupe ciclul dimeric ciclobutilpirimidinic *in situ*, restabilind bazele în forma lor monomerică originală.

În faza a treia, enzima este eliberată și ADN revenit la structura sa normală se poate replica.

Mecanismul intim al procesului nu este încă elucidat. Procesul de fotoreactivare este caracterizat printr-o acțiune foarte rapidă și printr-o mare fidelitate. El reprezintă un mecanism reparator foarte simplu, specific, fără greșeli care permite recuperarea celulelor lezate cu o mare frecvență. Gena *phr* situată pe harta genetică a *E. coli* într-o poziție corespunzătoare la 16 minute, pare să fie — dacă nu universal răspândită — prezentă la cele mai multe bacterii. Ea lipsește la *Micrococcus radiodurans*, organismul cunoscut drept cel mai rezistent la radiații. El poate supra-

Distorsiune structurală
(dimer de timină)



1) Complex enzimă-ADN



2) Absorbția luminii



3) Eliberarea enzimei



Fig. 116. — Reprezentarea schematică a etapelor fotoreactivării enzimatice a dimerilor de pirimidină (după Hanawalt, 1972).

vieții la doze de radiații UV de 1 000 de ori mai mari decât cele care omoară *E. coli*, deoarece este dotat cu un sistem reparator foarte eficient de reparație prin excizie (Boling și Setlow, 1966, Witkin, 1976). După Hélène (1984), gena *phr* și sistemul de fotoreactivare sînt prezente și la eucariote (levuri, alge, reptile, marsupiale). Ele sînt însă absente la mamiferele placentare, inclusiv la om (Hanawalt, 1972; Painter, 1974).

Reparația prin excizie și resinteză

Mecanismul de reparație prin excizie și resinteză, descoperit simultan de Howard-Flanders și Boyce (1964) și de Setlow și Carrier (1964), se bazează pe excizia enzimatică a fragmentului lezat, urmată de resinteza segmentului îndepărtat, utilizînd ca model informația genetică de pe catena complementară rămasă intactă. Demonstrarea existenței acestui mecanism s-a făcut urmărind încorporarea timidinei radioactive în structura ADN nou sintetizat de către o tulpină bacteriană rezistentă la UV (UV^R), comparativ cu o tulpină sensibilă (UV^S). După cultivarea separată, în medii cu timidină radioactivă, testarea prezenței timinei radioactive, după 30 de minute de la expunerea la radiații UV, a arătat că în celulele UV^S , timina încorporată, respectiv dimerii de timidină formați prin iradiere, era asociată cu moleculele de ADN intacte. În celulele UV^R , dimerii de timidină formați erau găsiți asociați cu mici segmente de ADN, lungi de 3 baze fiecare. Aceasta demonstrează că, spre deosebire de procesul de fotoreactivare în care dimerii de T sînt clivați *in situ* la monomerii respectivi, în reparația la întuneric erau îndepărtați din molecula de ADN prin excizia segmentului în care s-au format.

În funcție de particularitățile biochimice ale fazei inițiale a procesului — incizia catenei lezate — au fost descrise două variante ale procesului reparator prin excizie și resinteză. În prima variantă, incizia este realizată direct prin acțiunea unei endonucleaze specifice pentru leziune, ea, de exemplu, *endonucleaza Uvr ABC* (Sancar și Rupp, 1983), iar în cea de-a doua, prin intervenția secvențială a unei glicozilaze specifice pentru leziune și a unei endonucleaze apurinice/apirimidinice (*AP-endonucleaza*). (Lindahl, 1982).

Reparația prin excizie și resinteză la *E. coli*. Evoluția acestui proces a fost studiată cel mai mult în legătură cu îndepărtarea dimerilor de pirimidină produși de iradierea UV, deși poate avea loc și pe alte tipuri de leziuni. Îndepărtarea acestora este un proces multienzimatic care evoluează după modelul descris sub denumirea „taie și lipește” („cut and patch process”). Studiile de biochimie și de genetică au demonstrat că etapa inițială a procesului — incizia catenei lezate — este dependentă de activitatea produșilor a cel puțin trei gene: *uvr A*, *uvr B* și *uvr C* (*uvr* = ultra-violet resistance). Dovada o constituie faptul că mutațiile localizate la nivelul oricăreia dintre aceste gene fac celulele sensibile la acțiunea agenților lezanți. Produsul genei *uvr A* este o proteină de legare *Uvr A*, avînd g.m. ~ 100 000 dal, iar cei ai genelor *uvr B* și *uvr C* apar ca un complex cu g.m. ~ 70 000 dal (Seeberg, 1978).

Fig. 117 prezintă schematic următoarele etape în evoluția procesului la *E. coli* (Howard-Flanders, 1981): a) inițial, proteinele *Uvr A* și *Uvr B* se leagă de molecula de ADN, la nivelul situsului lezât; după ce au „recunoscut” leziunea produsă de dimerul de T, sau de alt agent lezant (1);

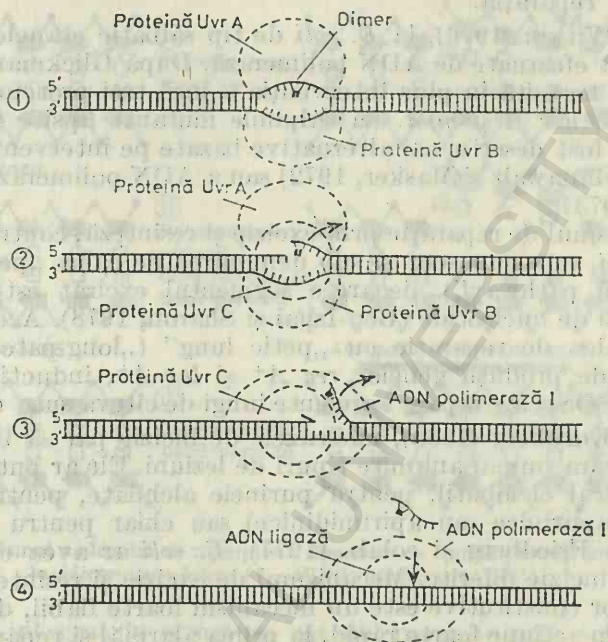


Fig. 117. — Reparația prin excizie îndepărtează dimerii de pirimidină și alte leziuni ale ADN printr-un proces „taie și pune petic” („cut and patch”). 1. Proteinele *UvrA* și *UvrB* se leagă de situsul lezât. 2. Probabil cu ajutorul proteinei *UvrC*, ADN pol I se leagă la nivelul inciziei și adaugă nucleotide la extremitatea 3' pe bază de complementaritate. 3. Polimeraza face o a doua incizie în catenă pentru a îndepărta regiunea lezată. 4. Ea poate continua degradarea nucleotidelor, înlocuindu-le, unul câte unul, prin translația inciziei spre dreapta. Final, incizia (săgeata groasă) este închisă de ADN ligază, care completează reparația (după Howard-Flanders, 1981).

b) în faza următoare, cu ajutorul proteinei *Uvr C* se produce o incizie la extremitatea 5' a regiunii lezate (2). După Joklik și Willet (1976), funcția principală a proteinei *Uvr C* ar fi de a împiedica în mod specific reparația imediată și închiderea inciziei de către ADN ligază, asigurând astfel funcționarea ADN polimerazei I; c) în continuare, în prezența proteinei *Uvr C*, ADN polimeraza I se leagă la nivelul inciziei și începe sinteza segmentului excizat, prin adăugarea de nucleotide, în conformitate cu regulile normale de împerechere a bazelor. Ea utilizează ca „primer” gruparea 3'-OH a nucleotidului, care mărginește incizia, iar ca matriță catena intactă. În același timp, polimeraza face o a doua incizie în catenă, asigurând astfel eliberarea și îndepărtarea segmentului lezât (3). O altă posibilitate este aceea ca ADN polimeraza care are și o funcție exonucleolitică 5' → 3' să continue îndepărtarea nucleotidelor și înlocuirea lor, unul câte unul,

printr-o mișcare de translație a inciziei de la stînga spre dreapta. În acest caz, ea ar funcționa ca o *polimerază progresivă* („processive polymerase”), care efectuează hidroliza secvențială a legăturilor fosfodiester și alungirea continuă a polimerului, fără să se disocieze de complexul inițiator — matrită („primer-template”). Final, incizia este închisă de ADN ligază care completează reparația.

După Witkin (1976), la *E. coli* de tip sălbatic etapele de excizie și resinteză sînt efectuate de ADN polimerază. După Glickman (1974), excizia eficientă necesită în plus intervenția a încă trei proteine, produse de genele *uvr C*, *uvr E* și *mfol*. La tulpinile mutante lipsite de ADN polimeraza I au fost descrise căi alternative bazate pe intervenția ADN polimerazei II (Hanawalt și Masker, 1972) sau a ADN polimerazei III (Young și Smith, 1973).

Mecanismul de reparație prin excizie și resinteză, controlat de genele *uvr* la *E. coli*, este cunoscut și sub denumirea de calea „peticului scurt” („short-patch pathway”), deoarece segmentul excizat este, în general, lung de ~ 20 de nucleotide (Ben-Ishai și Sharon, 1978). Acesta, spre deosebire de calea de reparație cu „petic lung” („long-patch pathway”), dependentă de produșii genelor *rec A*⁺ și *lex A*⁺, inductibilă în cursul răspunsului SOS, care repară segmente lungi de cîteva sute de nucleotide.

După Kornberg (1980), nucleazele de incizie par să fie specializate pentru a repara numai anumite tipuri de leziuni. Ele ar putea fi specifice pentru dimerul ciclobutil, pentru purinele alchilate, pentru situsuri cu baze lipsă (apurinice sau apirimidinice) sau chiar pentru baze inserate greșit. După Friedberg și colab. (1977), *E. coli* ar avea cel puțin cinci nucleaze de incizie diferite. Mecanismul de excizie și resinteză prin acțiunea enzimelor constitutive este un mecanism foarte fiabil, datorită faptului că intră în acțiune foarte rapid, la prima alarmă, și repară în principiu fără erori.

Reparația prin excizie și resinteză la *Micrococcus luteus*. Al doilea mecanism de reparație prin excizie și resinteză, descris la *M. luteus* de Grossman și colab. (1980) și de Haseltine și colab. (1980), este efectuat de trei enzime implicate în excizie și alte două în reparația finală. Spre deosebire de mecanismul descris la *E. coli*, în acest caz incizia catenei lezate este efectuată de o ADN glicozilază.

Evoluția procesului de reparație urmează următoarele etape (fig. 118), în cazul exciziei dimerilor de pirimidină produși de iradierea UV: 1) recunoașterea leziunii, determinată probabil de distorsiunea locală produsă de leziunea dimeră în catena de ADN; 2) secționarea catenei lezate, realizată prin intervenția secvențială a două enzime: a) ADN glicozilaza care, după ce recunoaște leziunea, secționează legătura dintre dezoxiriboză și prima bază a dimerului, creînd astfel un situs apirimidinic (respectiv care a pierdut o bază pirimidinică), și b) Ap-endonucleaza (Ap-apirimidin), care recunoaște situsul lipsit de baza pirimidinică produs în etapa anterioară, după care secționează catena de ADN lezat la nivelul egăturii dintre dezoxiriboză și radicalul fosfat; 3) excizia segmentului lezat este realizată de cea de a treia enzimă, exonucleaza; 4) procesul de resinteză și reparație finală este realizat de o ADN polimerază, care astupă

breșă formată prin îndepărtarea fragmentului lezat, prin sinteza unui segment nou de ADN, lung de ~ 20–50 nucleotide, utilizând catena opusă, intactă ca model; 5) în ultima fază a procesului, segmentul de ADN nou

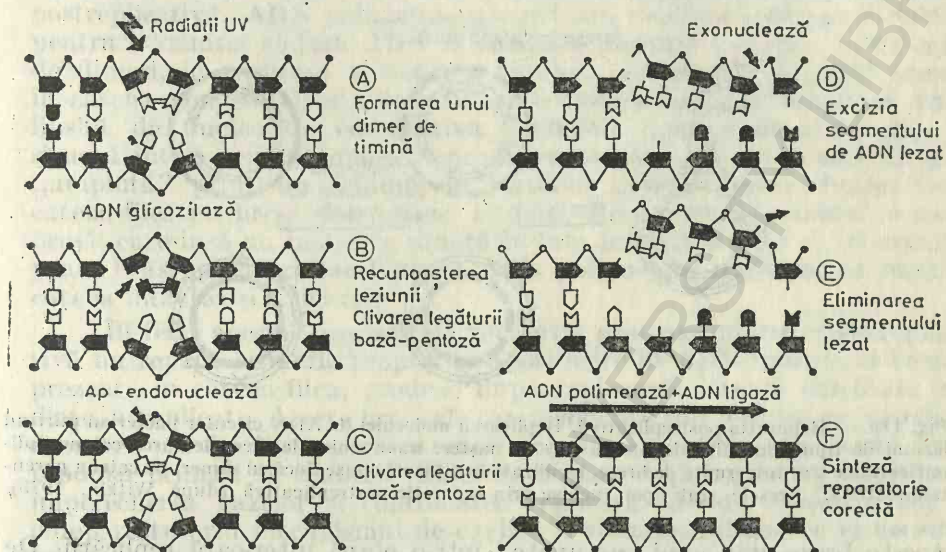


Fig. 118. — Mecanismul molecular de reparație a dimerilor de timină produși prin iradierea UV, la *Micrococcus luteus* (A–F) (după Sarasin, 1981).

sintetizat este integrat în structura catenei reparate prin acțiunea ADN ligazei.

Reparația prin recombinare postreplicativă

Procesul de reparație prin recombinare a fost descris de Howard-Flanders și Rupp (1968), la tulpinile de *E. coli* incapabile să desfășoare reparația prin excizia dimerilor de pirimidină.

Existența unui proces reparator cu mecanism diferit de excizie a fost demonstrată de Clark și Margulis, prin studiul mutantelor bacteriene sensibile la UV. Aceste mutante deficiente în capacitatea de a efectua recombinații genetice, tolerau dozele de radiații care produceau mai multe zeci de dimeri în cromosomul bacterian, a căror reparație era efectuată prin excizie. Celulele dublu mutante însă, lipsite atât de capacitatea de reparație prin excizie, cât și de cea de recombinare genetică erau omorite chiar de dozele de UV care produceau numai un singur sau cel mult doi dimeri. Ulterior, s-a demonstrat că recombinația genetică participă în fenomenele de reparație a leziunilor ADN, pentru a ocoti dimerul.

O observație fundamentală pentru identificarea noului mecanism a fost legată de faptul că în celulele iradiate cu UV, catenele nou sintetizate aveau o greutate moleculară relativ mai mică decât catenele martor.

S-a emis ipoteza, verificată ulterior prin date experimentale biochimice și genetice, că replicarea moleculei de ADN circular cromosomal, purtător de dimeri de timină ar fi însoțită de producerea de breșe („gaps”) în catenele complementare nou sintetizate, în poziții opuse dimerilor (fig. 119).

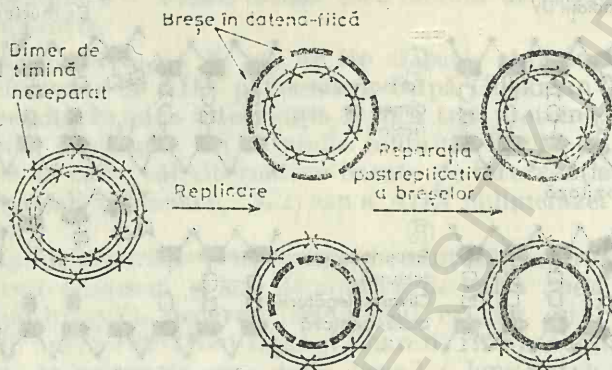


Fig. 119. — Reparația postreplicativă. Replicarea moleculei de ADN circular bacterian purtând leziuni de tipul dimerilor de timină (X) dă naștere unor molecule-fiice ale căror catene polinucleotidice sînt întrerupte de breșe, localizate în situsuri opuse fiecărui dimer, pe catena parentală-matriță. Breșele sînt apoi închise prin reparație postreplicativă (după Witkin, 1975).

Aceste breșe erau apoi „astupate” într-o etapă ulterioară replicării. De aici denumirea de *reparație consecutivă replicării* sau *postreplicativă* („post-replication repair”).

Howard-Flanders (1968, 1975) a demonstrat că procesul reparator este mai complicat, fiind condiționat de o etapă de recombinare genetică între catena cu breșă și o catenă intactă (fig. 120).

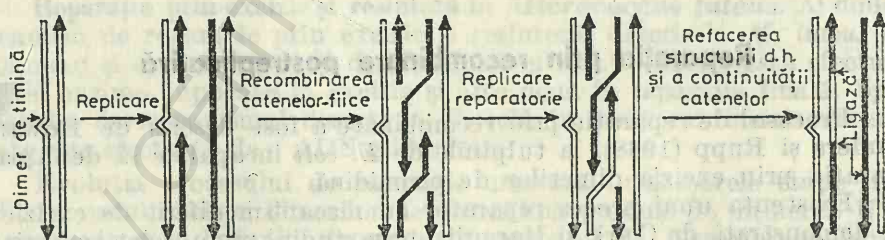


Fig. 120. — Reparația „postreplicativă” prin recombinare genetică. Catenă-fiică întreruptă, reprezentînd copia complementară a moleculei parentale ce poartă dimerul de timină, formează o pereche cu catenă „soră” neîntreruptă, care are polaritate opusă. Ulterior, aceasta se rupe la un situs corespunzător, pentru a forma o moleculă recombinantă „incestuoasă”. Breșele din catenă întreruptă sînt închise prin replicare reparatorie. Catenele parentale și cele, fiice devin helicale, iar ADN ligaza închide discontinuitățile din structura lor (după Stent, 1972).

Procesul de reparație prin recombinare postreplicativă a fost studiat cel mai mult pe moleculă de ADN purtătoare de dimeri de pirimidine, deși el este activ și pe leziuni produse de o serie de alte tratamente. Modelul propus de Howard-Flanders și Rupp consideră că într-o celulă de *E. coli*

expusă la radiații UV, ADN este replicat normal de-a lungul regiunilor nelezate ale catenelor parentale. Prezența leziunilor dimerice, care nu au fost îndepărtate prin fotoreactivare sau excizie are tendința de a bloca înaintarea complexului de replicare. În cursul reparației prin recombinare postreplicativă, ADN polimeraza „sare” sau ocolește leziunea dimerică, pentru a reiniția sinteza ADN la oarecare distanță ($\sim 100-1\,000$ baze) de dimeri, în regiunea normală a catenei „template”. În felul acesta, în catena nou sintetizată se produce o discontinuitate (breșă sau hiat) lipsită de nucleotide consecutivă replicării („post-replication gaps”), situată într-o regiune opusă regiunii lezate. Această breșă este ulterior „umplută” printr-un schimb de material genetic (recombinare) între catena-fiică cu breșă și o catenă intactă. Recombinarea creează o nouă breșă, care însă nu mai este situată în fața leziunii dimerice și, ca urmare, poate fi astupată prin activitatea ADN polimerazei (utilizând ca matriță catena intactă) și a ligazei.

În felul acesta, procesul de reparație prin recombinare postreplicativă nu repară leziunile propriu-zise, prezente în ADN iradiat, ci breșele prezente în catena-fiică, produse după replicarea catenei parentale iradiate, nerePLICATE. Aceste breșe ale catenelor-fiice sînt leziuni „secundare”, deoarece provin din replicarea unei molecule de ADN care poartă foto-produșii primari ai iradierii (leziunile dimerice inițiale), ce au împiedicat împerecherea bazelor și continuarea replicării. Aceste breșe nu pot fi îndepărtate prin mecanismul de excizie și resinteză, deoarece el necesită existența unei catene complementare intacte. Or, în acest proces, una din moleculele dublu catenare rezultate din replicare este compromisă, deoarece o catenă poartă dimerul, iar cealaltă breșă anucleotidică. Recombinarea apare ca un proces menit să înlocuiască breșa cu o porțiune dintr-o catenă a moleculei duplex-soră. Repararea completă a ADN este consecința unei suite de recombinări, cîte una pentru fiecare dimer de pirimidină din ADN iradiat, ducînd final la refacerea unui genom lipsit de leziuni, funcțional normal. Catenele lezate sînt treptat „dilate” în mediu, dar leziunea lor nu este niciodată îndepărtată (fig. 121).

Fig. 122 ilustrează evoluția la nivel molecular a unui proces de reparație prin recombinare postreplicativă, în care o moleculă de ADN dublu catenar, iradiată cu UV, poartă trei dimeri de pirimidină notați cu A, B și C (1). Dimerii B și C sînt reparați prin mecanismul de excizie și resinteză (2, 3), în timp ce dimerul A interferează cu replicarea ADN. În cursul acesteia, catenele parentale se derulează la nivelul bifurcației de replicare, pentru a permite sinteza celor două catene-fiice (1). Deoarece ADN polimeraza „sare” dimerul, pentru a reiniția sinteza ADN la o anumită distanță de el, se produce o breșă postreplicativă în catena opusă lui (2). Proteina *Rec A* se leagă de regiunea monocatenară a ADN (3) și o aliniază față de o regiune omologă a moleculei duplex-soră. Cînd au loc împerecherile între bazele omologe, o enzimă determină apariția unei incizii („nick”) în molecula duplex (4). Proteina *Rec A* schimbă direcția capătului liber al catenei duplexului parental, dirijîndu-l spre breșă pentru a produce un schimb încrucișat de catene (5). În această fază, heteroduplexul superior poate fi reparat de ADN polimerază (6). După ce secvența corectă a fost așezată într-o poziție opusă dimerului A și proteina *Rec A*

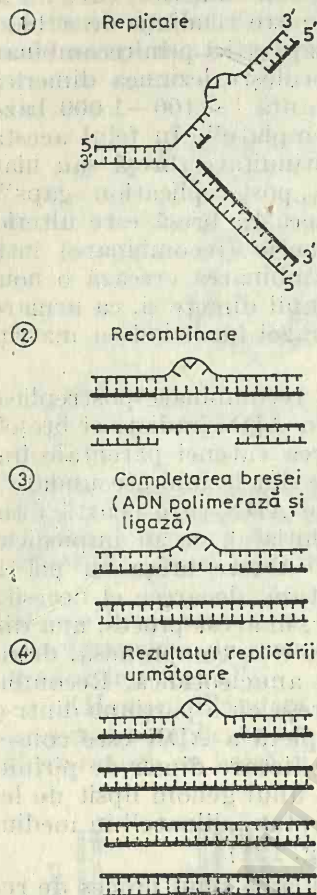


Fig. 121. — Modelul molecular de reparare prin recombinare postreplicativă. 1. Replicarea produce breșe în catena opusă regiunii parentale lezate. 2. După replicare, cealaltă catenă parentală furnizează o secvență nucleotidică cu care este „umplută” breșa. 3. ADN pol și ADN ligaza acoperă breșele rămase. 4. După replicarea normală următoare, unele molecule d.c. nu mai conțin nici o leziune. Catenă lezată este „diluată” progresiv, dar leziunea nu este îndepărtată niciodată (după Hanawalt, 1972).

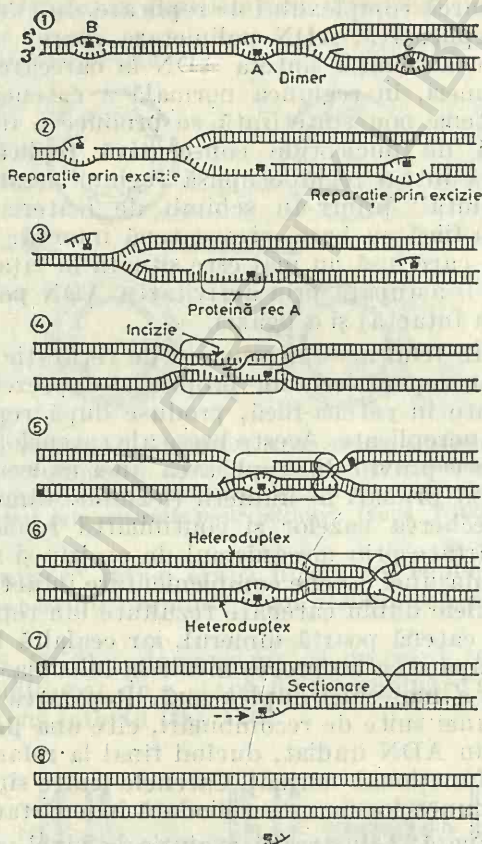


Fig. 122. — Reparația postreplicativă a unui dimer (A), care interferează cu replicarea. În cursul acesteia, catenele parentale se derulează la bifurcația de replicare și sintetizează două catene-fiice (1). Dimerii B și C sînt separați prin excizie. Dimerul A împiedică replicarea, determinînd apariția unei breșe postreplicative pe catena opusă (2). Proteina RecA se leagă de regiunea m.c. (3) și o aliniază cu o regiune omologă a dublei catene-surori. O enzimă produce incizii (4), iar RecA deplasează extremitatea liberă a unei catene parentale în breșă, favorizînd schimbul încrucișat între catene (5). Heteroduplexul superior poate fi separat de ADN pol. După ce dimerul A are o secvență opusă corectă și proteina RecA este eliberată, dimerul A este îndepărtat de enzimele care repară prin excizie (6). Final, o enzimă produce două incizii la nivelul situsului de schimb încrucișat al catenelor (7), terminînd procesul de recombinare, cu formarea a două molecule heteroduplex intacte (8) (după Howard-Flanders, 1981).

se desprinde de ADN, dimerul A este îndepărtat de către enzimele de excizie și resinteză. În cele din urmă, o enzimă determină două secțiuni la nivelul regiunii în care a avut loc schimbul încrucișat de catene (7), determinând formarea a două molecule heteroduplex intacte (8).

Reparația prin recombinare postreplicativă este efectuată la *E. coli* cu mare fidelitate, pe mai multe căi distincte, dar care, toate, necesită existența genotipului *rec A*⁺. Ea reprezintă mecanismul major de reparație prezent la celulele *uvr*⁻, lipsite de mecanismul de reparație prin excizie. Importanța sa pentru celulele bacteriene este evidențiată de cazul mutanților *uvr*⁻, *recA*⁻, care nu fac nici reparație prin excizie și nici prin recombinare, a căror sensibilitate la iradierea UV este atât de mare încât prezența unui singur dimer de pirimidină pe o catenă este letală (Howard-Flanders, 1981).

Sistemul reparator inductibil „SOS”

Expunerea *E. coli* la acțiunea unor agenți sau condiții care determină lezarea severă a ADN sau care interferează cu replicarea acestuia determină intrarea în acțiune, cu o intensitate mărită, a genelor care fac o parte din așa-numita rețea de reglare „SOS” („SOS regulatory network”). Ipoteza existenței unui sistem reparator inductibil a fost emisă inițial de Defais și colab. (1971) și dezvoltată de Radman (1974, 1975), pe baza observației că o serie de fenomene fiziologice diferite, care apar după lezarea ADN, par să fie sub controlul coordonat a două gene, numite *rec A* și *lex A*. Identificarea acestor două gene reglatoare, clonarea lor, izolarea și caracterizarea biochimică a produșilor lor, precum și demonstrarea apartenenței lor la aceeași rețea de reglare au permis elucidarea multor aspecte ale mecanismului de reglare „SOS” la nivel molecular. Interesul deosebit pentru studiul aprofundat al răspunsului „SOS” este determinat, în mare măsură, de faptul că exprimarea lui afectează profund biologia celulei bacteriene, prin consecințele mutagene ale acțiunii diferiților agenți, care produc leziuni ale moleculei de ADN.

Demonstrarea existenței unui sistem de reparație inductibil. Reactivarea-W. Prima demonstrație a existenței unui sistem reparator inductibil a fost făcută prin studiul dinamicii reparației de către celula-gază a genomului ADN aparținând fagului lambda (ADN λ), după iradiere cu UV. Cu această ocazie, s-a demonstrat că dacă fagiile λ iradiate infectează o celulă de *E. coli* normală, numărul centrilor infecțioși (plajelor de liză) obținuți după dispersia preparatului fagic pe suprafața unei culturi bacteriene „în pînză” este foarte mic. Celulele-gază nu sînt capabile să repare toate leziunile produse de radiațiile UV în timpul necesar pentru a asigura funcțiile fagice normale. Dacă însă, celulele de *E. coli* sînt în prealabil iradiate cu UV — înainte de infecție — pentru a declanșa intrarea în funcție a sistemului inductibil, leziunile din ADN λ iradiat vor fi reparate mult mai ușor și mai eficient și numărul plajelor de liză va fi mult mărit. Majoritatea particulelor fagice dezvoltate în aceste condiții prezintă însă mutații la nivelul ADN.

Fenomenul a fost descris de către Weigle (1953) și este cunoscut sub denumirea de reactivarea-W („W-reactivation”). Ulterior, s-a demonstrat că nu iradierea celulei bacteriene cu UV — *per se* — induce apariția sistemului reparator SOS (și deci reactivarea-W), ci însăși leziunea ADN produsă de UV. În acest scop, celule de *E. coli* Hfr sau F' iradiată au fost puse în condiții adecvate pentru conjugarea lor cu celule F⁻ neiradiate. S-a demonstrat că ADN lezat, transferat prin conjugare, determină inducția sistemului reparator SOS în celula receptoare. Inducția are loc după o perioadă de ~ 30 minute, necesară pentru ca enzimele de reparație să ajungă la un nivel de concentrație optim.

Ipoteza „SOS”. Sistemul prin care *E. coli* repară leziunile mari ale ADN este numit *sistemul de reparație „SOS”* („SOS repair”). Această ipoteză, formulată de către Radman (1974), a fost confirmată de o serie de probe experimentale, care pledează pentru ideea că, în anumite cazuri, leziunile ADN sînt de așa natură, încît nu pot fi reparate de mecanismele de reparație constitutive; fapt care periclitează viața celulei. Termenul „SOS” („Save our souls”), corespunzînd semnalului internațional de avarie sau de primejdie a fost adoptat de Radman (1974, 1975), pentru a caracteriza situația în care celula, incapabilă să facă față situației, avînd existența periclitată de legarea sau blocarea replicării ADN, lansează un semnal de alarmă, făcînd apel la un sistem special de ajutor. În cazul în care acest mesaj este sesizat la timp, el declanșează intrarea în activitate a unui sistem inductibil, care ajută la eliminarea leziunilor și la reluarea replicării ADN.

Witkin (1976) definește „reparația SOS” ca o activitate reparatoare indusă la *E. coli* de iradierea UV, sau de alți agenți, care au în comun capacitatea de a leza ADN sau de a întrerupe sinteza acestuia. Această activitate este dependentă de producția genelor *rec A*⁺ și *lex A*⁺. Studiul mecanismelor moleculare ale reparației SOS a demonstrat că în realitate producția genelor *rec A*⁺ și *lex A*⁺ controlează în asociere un grup de mai multe funcții inductibile diferite, regulate coordonat, care sînt derepresate simultan și care, probabil, contribuie la supraviețuirea celulei și a fagilor săi. Datorită acestui fapt mutațiile la nivelul genelor *rec A* și *lex A* au efecte pleiotrope.

Witkin (1976) a denumit grupul de funcții inductibile, care aparțin unității de reglare *rec A*⁺ — *lex A*⁺ „funcțiile SOS”. Ele includ, pe lîngă activitatea de reparație a ADN lezat, inducția litică a unor fagi ai *E. coli*, întîrzierea diviziunii celulare care duce uneori la apariția de filamente, inhibarea activității de degradare a ADN de către exonucleaza V și reinițierea aberantă a sintezei ADN la originea cromosomului (tabelul nr. 18).

Exprimarea acestui ansamblu de funcții este legată la *E. coli* de intervenția unui număr mare de gene, dintre care 16 au fost identificate pînă în prezent și plasate pe harta genetică (fig. 123).

Leziunile care necesită intervenția sistemului SOS se formează cel mai adesea cînd doi dimeri de pirimidină, situați pe catenele opuse ale moleculei parentale, sînt suficient de apropiați pentru a produce apariția de breșe care se suprapun („overlapping gaps”). Acestea se formează ca atare de la început, în urma replicării, sau sînt lărgite prin degradare enzimatică ulterioară a ADN (Sedgwick, 1975). Astfel de breșe supra-

Tabelul nr. 18

Efectele p'eiotrope ale mutațiilor *rec A*⁻ și *lex A*⁻ la *Escherichia coli*, interpretate în acord cu ipoteza „SOS” (după Witkin, 1976)

Fenotipul	<i>rec A</i> ⁺ <i>lex A</i> ⁺	<i>rec A</i> ⁻	<i>lex A</i> ⁻	Funcții posibile (SOS) inductibile, dependente de <i>rec A</i> ⁺ și <i>lex A</i> ⁺
Sensibilitate la UV	+	+++	++	Activitate repara- toare „SOS”; in- hibitor al exonu- cleazei V
Sensibilitate la radiațiile X	+	+++	+++	Activitate repara- toare a breșelor monocatenare, de- pendentă de me- diul de creștere; inhibitor al exo- nucleazei V
Inducția litică a profagului λ cu UV	+	—	±	Creșterea litică a fagului
Degradarea ADN după iradiere UV	+	+++	+++	Inhibitor al exo- nucleazei V
Reactivarea-W mutagenă a fagului λ	+	—	—	Activitate repara- toare SOS
Mutageneză bacteriană după iradiere UV	+	—	—	Activitate repara- toare SOS
Reinițierea aberantă a replicării ADN, la originea cromosomală după sto- pare	+	—	—	Proteine de reini- țiere
Diviziune celulară întârziată după iradiere UV (în cazuri extreme, creș- tere filamentoasă)	+(<i>lon</i> ⁺) +++ (<i>lon</i> ⁻)	—	—	Inhibarea formă- rii septului trans- versal de diviziune
Sinteza proteinei X, după tratare cu raze X sau acid nalidixic	+	—	—	Proteina X (<i>Rec A</i>)
Înteruperea respirației după iradiere UV	+	—	—	Proteina de reglare a respirației
Calea de replicare postreplicativă, sensibilă la cloramfenicol	+	—	—	Reparație „SOS”
Calea de reparație prin excizie cu „petic lung” („long patch”)	+	—	—	Reparație „SOS”
Inducibilitate termică a funcțiilor „SOS” a tulpinilor mutante <i>tif-1</i>	+	—	—	Toate funcțiile de mai sus
Capacitate de recombinare	+	—	+	

puse sint refractare la orice tip de reparație realizată de enzimele constitutive și de aceea sint letale la tulpinile incapabile de activitate SOS (Witkin, 1976).

Mecanismul molecular al reparației „SOS”. Natura procesului de reparație inductibil SOS a fost o scurtă perioadă de timp ignorată și are încă și în prezent unele aspecte neelucidate.

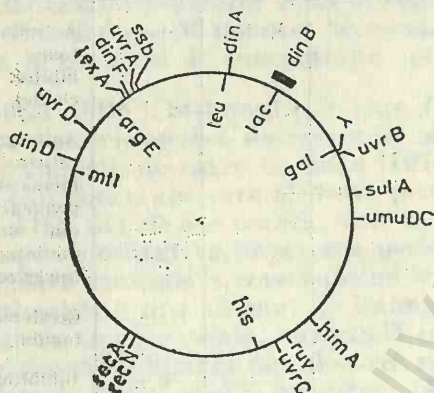


Fig. 123. — Localizarea cromosomală a genelor implicate în activitatea reparatorie SOS la *E. coli*.

Prima probă experimentală privind rolul anumitor enzime bacteriene în reparație și recombinare a fost adusă de Clark (1965), care a descoperit o categorie de mutante bacteriene cu leziuni la nivelul genei *rec A* a *E. coli*. Aceste mutante sint incapabile de recombinare genetică după conjugare sau transducție fagică. Ele se conjugă, sint infectate de fagii transductori, acceptă ADN exogen, dar sint incapabile să-l integreze prin recombinare. Concluzia a fost că produsul genei *rec A* controlează formarea enzimelor necesare pentru recombinarea genetică.

În același timp, s-a demonstrat că în afară de incapacitatea de recombinare genetică, mutantele *rec A⁻* prezintă o sensibilitate anormal de mare față de iradierea cu UV. Hartman și Luria (1967) au confirmat aceste date și au arătat că bacteriile lizogene *rec A⁻* nu sint inductibile: fagul lambda rămâne în stare de profag latent, chiar după iradierea cu UV, ceea ce permite concluzia că gena *recA* funcțională este necesară pentru inducția litică. Proba este constituită de faptul că în cazul bacteriilor *recA⁺* lizogene, profagul este eliberat din cromosom. Pe lângă inducția litică în celula iradiată are loc declanșarea ansamblului funcțiilor SOS și între acestea sinteza unei mari cantități de proteină X (Gudas și Pardee, 1976).

Ulterior s-a demonstrat că proteina X, numită și enzima de clivare a proteinelor („protein-cleaving enzyme”), datorită activității sale proteolitice este identică cu proteina *Rec A* (Little și Kleid, 1977; Emmerson și West, 1977). Reglarea răspunsului de reparație SOS a fost în mare parte lămurit prin analogie cu fenomenul, de altfel foarte diferit, de inducție litică a fagului lizogen lambda al *E. coli*, însă bine cunoscut la nivel molecular. După cum s-a demonstrat, în cursul evoluției lizogene a *E. coli*, genomul fagic este integrat în cromosomul bacterian și menținut latent ca profag, prin intervenția unei proteine-represor, care blochează exprimarea

tuturor genelor fagice, cu excepția celei care codifică represorul. Acesta se leagă de gena operator pe ADN profagic și împiedică legarea ARN polimerazei care are rolul de a transcrie genele fagice la ARNm. În cursul infecției litice represorul dispare. El este eliberat de pe ADN profagic și clivat în două subunități inactive, sub acțiunea proteinei *Rec A*, capabilă de activitate proteolitică (Roberts și Roberts, 1975; Phizicky și Roberts, 1980).

Rolul proteinei *Rec A* în reparația „SOS” este esențial și complex. În procesul reparator SOS ea are două funcții diferite, dar fundamentale pentru evoluția acestuia: 1) funcția de protează în activitatea de reglare a sistemului și 2) funcția de enzimă de recombinare în reparația postreplicativă. Mutantele *rec A⁻* sau *rec A(def)*, după notația lui Walker (1984), sint defective în capacitatea de recombinare genetică generală, în exprimarea sistemului inductibil de reparație SOS și, ca urmare, sint foarte sensibile la acțiunea radiațiilor UV.

1) *Funcția proteolitică.* Activitatea proteolitică a proteinei *Rec A* are ca substrat de acțiune represorul fagului lambda, cu consecința inducției litice în cazul evoluției lizogene în *E. coli* (Roberts și colab., 1978; Phizicky și Roberts, 1980), și proteina *Lex A*, în cursul reparației SOS (Little și colab., 1981). Semnalul generat de lezarea ADN duce la o biosinteză crescută a proteinei *Rec A*, dar simpla supraproducție nu este suficientă pentru inducția răspunsului SOS. Esențială pentru clivarea proteinei *Lex A* și a represorului λ este activarea funcției sale proteolitice. Dovada o constituie faptul că celulele de *E. coli* neinduse conțin fiecare, ~ 800—1 200 molecule de proteină *Rec A* (Salles și Paoletti, 1983) și de demonstrarea faptului că clivarea proteolitică a unei părți din proteinele *Lex A* și represorul λ poate fi asigurată fără sinteza *de novo* a proteinei *Rec A* (Sedgwick și colab., 1981). În general însă, în cazul tipului sălbatic al *E. coli* (*rec A⁺*), proteina *Rec A* este detectată în cantități mult mărite după iradiere cu UV, spre deosebire de mutantele *rec A⁻* sau de celulele tratate cu agenți care nu induc răspunsul SOS (Mc Entee, 1977). Activarea funcției proteolitice a proteinei *Rec A* este reversibilă și implică o modificare conformațională a acesteia. Nu se cunosc exact toate aspectele mecanismului de activare *in vivo*.

2) *Funcția de enzimă de recombinare.* După Witkin (1976) și Howard—Flanders (1981), funcția primară a proteinei *Rec A* în recombinarea postreplicativă este aceea de a stimula formarea de perechi omologe între două molecule de ADN, adică de a pune regiuni care au secvențe de baze complementare într-o aliniere precisă, în vederea interschimbului de catene.

Mecanismul exact al acestui proces nu este cunoscut. Este probabil că inițial proteina *Rec A* pune în contact nespecific molecula de ADN d.c. intactă și cea care prezintă o discontinuitate monocatenară. Ulterior, cele două molecule s-ar deplasa, una în raport cu cealaltă, pînă cînd bazele complementare se aliniază unele față de altele. Procesul se realizează cu consum de ATP. Imperecherea omologă necesită cantități mari de proteină *Rec A* (~ o moleculă de *Rec A* pentru cinci perechi de baze, după Howard—Flanders, 1981), pentru a conferi moleculei lezate rezistența necesară, pentru a o menține în contact cu cea nelezată și pentru a asigura mișcarea de translație, care asigură stabilirea contactelor complementare.

Mișcarea relativă ar putea fi comparată cu aceea a omizilor : ADN cu leziunea produsă de lipsa de continuitate se lungeste și apoi se contractă pe măsură ce proteina *Rec A* se leagă de ea și apoi este eliberată, cind ATP este degradat. După ce moleculele de ADN sint aduse într-o aliniere perfectă, pentru o anumită regiune, proteina *Rec A* acționează pentru a facilita schimbul efectiv între catene (recombinarea). Completarea reparației necesită prezența unei nucleaze (care secționează catenele în diferite stadii ale interschimbului), a ADN polimerazei (pentru a insera bazele care lipsește pentru umplerea hiatului), a unei ligaze și probabil a altor enzime.

Rolul genei lex A și al produsului său în reparația „SOS”. Înainte de cristalizarea conceptului de reparație „SOS” Mount și colab. (1973), precum și Brooks-Low și colab. (1978) au arătat că produsul genei *lex A* are un rol important în procesele de reparație a ADN, la *E. coli* K12. Ei au studiat comportarea unor tulpini de *E. coli* parțial diploide, respectiv a unor bacterii care poartă un segment suplimentar de ADN cromosomal. În aceste celule, unele gene sint prezente în două versiuni, funcționale «+» și nefuncționale «-». Cu această ocazie au demonstrat că celulele care poartă în același timp gena de tip sălbatic *lex A*⁺ și gena mutantă *lex A*⁻ prezintă fenotipul *lex A*⁻ ceea ce demonstrează că mutantele *lex A*⁻ sint dominante. Prin analogie cu alte situații similare, caracterul de dominanță a genelor mutante a fost interpretat ca un semn că gena *lex A* este implicată în procese de reglare (Howard-Flanders, 1981). Astfel, se știa că mutațiile în gena *lac I* a *E. coli*, care codifică proteina represor ce controlează exprimarea genelor implicate în metabolismul lactozei, sint dominante.

Continuind analogia, s-a emis ipoteza că gena *lex A* ar codifica, de asemenea, o proteină represor, capabilă să regleze sinteza enzimelor de reparație și să controleze genele răspunzătoare de răspunsul SOS. Brent și Ptashne (1981), studiind mecanismul acțiunii proteinei *Lex A* (~ 24 000 dal) au arătat că ea are funcția normală de represor, prin legarea de secvențele nucleotidice cu funcție operator, situate în regiunea anterioară a ~14 gene ca *rec A*, *uvr A*, *uvr B*, *uvr C* etc., precum și a propriei sale gene *lex A* (tabelul nr. 19). Prin această acțiune, proteina *lex A* menține transcrierea ARNm și sinteza proteinelor respective la nivele foarte scăzute, caracteristice celulelor neinduse. Ca urmare, în cazul bacteriilor normale, fără leziuni în structura ADN, activitatea genelor și funcțiilor SOS este menținută represată. Faptul că proteina represor *Lex A* se leagă de mai multe gene diferite a fost explicat prin faptul că regiunile operator ale acestora ar fi similare.

Determinarea secvenței nucleotidelor în regiunile promotor/operator ale celor 14 gene din sistemul SOS, a demonstrat existența unui grad însemnat de omologie (Little și Mount, 1982). Fig. 124 prezintă secvențele regiunilor operator situate la începutul a patru din genele controlate de proteina represor *Lex A*, respectiv *rec A*, *lex A*, *uvr A* și *uvr B*. Ele au o lungime de 20 de nucleotide și reprezintă situsurile de legare ale represorului *Lex A*. Cele patru situsuri de legare numite „casete SOS” („SOS boxes”) conțin secvențe nucleotidice repetate invers (→ ←), care sint citite la fel în direcția 5' → 3' pe ambele catene, precum și secvențele comune CTG și GAC separate de 10 baze. Gena *lex A* are în regiunea operator două casete SOS aproape identice, în loc de una.

Brent (1982) a studiat interacțiunea fizică Lex A/operator și a demonstrat că proteina *Lex A* leagă o regiune din ADN cu lungimea de 18 perechi de baze. Legarea se face probabil prin extremitatea aminoterminală

Tabelul nr. 19

Denumirea și funcțiile principalelor gene implicate în procesul reparator și în recombinarea genetică la *Escherichia coli*

Grupul funcțional	Genă	Poziția pe harta genetică (minute)	Funcția și/sau produsul
Polimeraze	<i>pol. A</i>	76	ADN polimeraza I. Normal răspunzătoare de excizie și resinteză. Asigură repararea segmentelor scurte
	<i>pol. B</i>	2	ADN polimeraza II } Asigură repararea ADN polimeraza III } unor segmente lungi
	<i>pol. C</i>	4	
Reparație prin excizie	<i>uvr A</i>	91	Genă structurală pentru endonucleaza specifică UV, necesară pentru incizia inițială Genă structurală pentru o subunitate a <i>uvr A</i> Controlează o etapă tardivă în reparația prin excizie
	<i>uvr B</i>	18	
	<i>uvr C</i>	42	
Recombinare	<i>rec A</i>	51	Funcții multiple în recombinare și repararea ADN
	<i>rec B</i>	60	Genă structurală pentru exonucleaza V, dependentă de ATP, cu rol în recombinare și reparare
	<i>rec C</i>	60	ca și <i>rec B</i>
	<i>rec F</i>	73	Implicată în repararea postreplicativă, blochează inducția cu UV a fagului λ ; asigură o cale alternativă de recombinare
	<i>rec G</i>	32	Recombinare genetică
	<i>sbc B</i> (<i>xon A</i>)	44	Genă structurală pentru exonucleaza I; supresor pentru <i>rec B</i> și <i>rec C</i>
Alte funcții	<i>ruv</i>	41	Sensibilitate la iradierea cu UV. Producere de filamente bacteriene
	<i>lig</i>	45	Genă structurală pentru ADN ligază
	<i>phr</i>	17	Genă structurală pentru enzima de foto-reactivare
	<i>mfd</i>	80	Scăderea frecvenței mutațiilor
	<i>lon</i>	10	Formarea de filamente, indusă de iradierea cu UV
	<i>tif</i>	51	Mimează unele efecte ale iradierii cu UV, cind bacteriile cresc la temperaturi ridicate. Crește inducția pe cale termică a fagului λ și formarea de filamente bacteriene
	<i>lex A</i>	90	Inducția sistemului reparator „SOS”. Sensibilitate la radiații

a *Lex A*, deoarece unele molecule trunchiate, prin anumite tehnici, păstrează capacitatea de a represa parțial genele „SOS” *in vivo*. Studiile biochimice asupra proteinei *Lex A* au sugerat existența unor similarități funcționale importante cu represorul lambda. Astfel, ambele molecule

sint clivate la nivelul unei legături peptidice—alanină—glicocol situată în mijlocul polipeptidului. În plus, existența unor omologii între secvențele ADN și ale proteinelor respective sugerează existența unei înruderii evolutive între cele două molecule (Horii și colab., 1981 ; Sauer și colab., 1982).

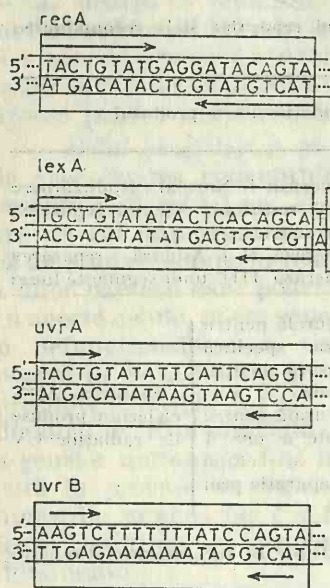


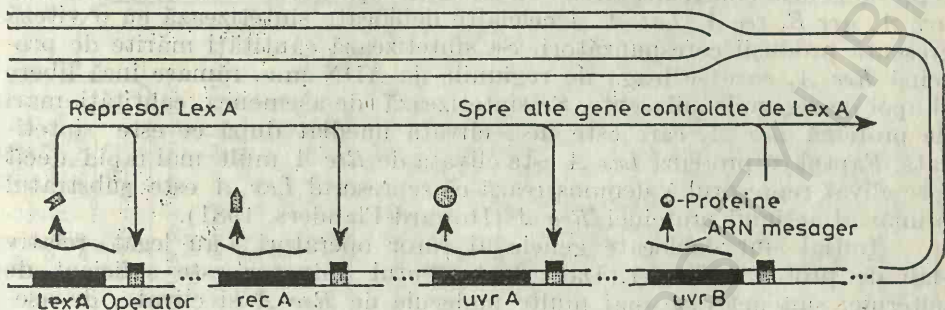
Fig. 124. — Regiunile operator situate la începutul celor patru gene (*rec A*, *lex A*, *uvr A* și *uvr B*), controlate de proteina Lex A, conțin secvențe similare, având ~20 pb., care servesc ca situsuri de legare pentru represor. Toate situsurile de legare („SOS boxes”) includ secvențe repetate invers ($\rightarrow \leftarrow$), care sînt citite la fel, în direcția $5' \rightarrow 3'$, pe ambele catene. Ele includ secvențele CTC și CAG separate de 10 baze. Gena *lex A* conține două secvențe SOS aproape identice (după Howard-Flanders, 1981).

Modelul de reglare „SOS”. Mecanismul de reglare a sistemului de reparație SOS, la nivel molecular, este în prezent cunoscut (fig. 125, Howard-Flanders, 1981).

Pe baza numeroaselor date acumulate în intervalul de timp foarte scurt de la descoperirea acestui sistem, Walker (1984) propune următoarea schemă de evoluție. Într-o celulă bacteriană nelezată, care se dezvoltă normal, produsul genei *Lex A* acționează ca represor pentru majoritatea genelor „SOS”, inclusiv genele *rec A* și *lex A*. El realizează acest lucru, legîndu-se de secvențele promotor/operator similare, situate la începutul fiecărei gene „SOS”. Unele dintre acestea, ca de exemplu gena *rec A*, are un singur situs de legare, în timp ce altele (*lex A*, *umu C*, *umu D*) au două situsuri operator, aproximativ similare. Unele gene „SOS”, ca *rec A*, *lex A*, *uvr*, sînt exprimate la nivele semnificative chiar în stare represată. Ca urmare, cantitatea de proteină *Rec A* prezentă în celula normală este suficientă pentru a satisface nevoile acesteia în recombinația genetică omologă (Karu și Belk, 1982 ; Salles și Paoletti, 1983). De asemenea, proteinele *uvr* se găsesc în cantitate suficientă pentru a asigura reparația leziunilor ADN care apar sporadic, prin mecanismul reparativ de excizie și resinteză. În sfîrșit, cantitatea de proteină represor *Lex A* este suficientă pentru a ocupa regiunile promotor/operator ale genelor sistemului „SOS” și de a le menține în stare represată. Cînd celulele sînt expuse unor leziuni importante de ADN, ce nu pot fi reparate de puținele enzime de reparație, prin excizie și resinteză, prezente constitutiv, în molecula de ADN dublu

catenar apar zone de discontinuitate sau breșe („gaps”) monocatenare postreplicative. În acest caz, moleculele de proteină *Rec A* prezente în celulă se leagă de ADN monocatenar rămas intact, în regiunea opusă bre-

Stare neindusă



Stare indusă

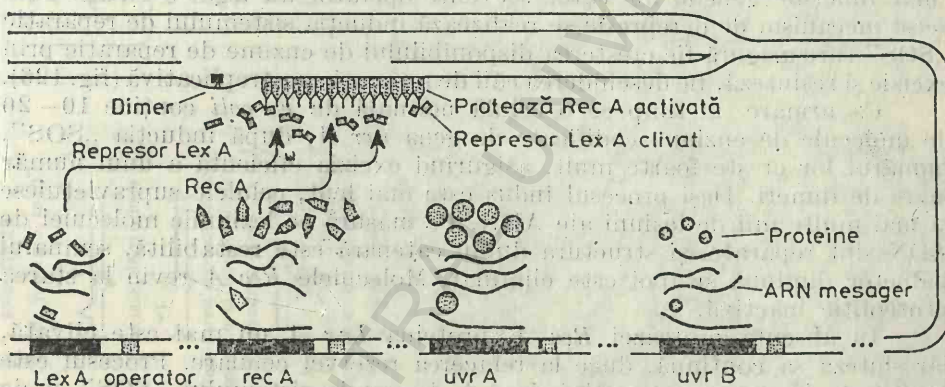


Fig. 125. — Sistemul de reglare bazat pe funcția genelor *lex A* și *rec A* este inactiv în cursul creșterii normale, în absența leziunilor ADN (sus). Represorul Lex A se leagă de operatorii *lex A*, *rec A*, *uvr A*, *uvr B* și ai altor gene, menținând sinteza ARNm și a proteinelor la nivele scăzute, caracteristice celulelor neinduse. Lezarea ADN suficientă pentru a produce breșe, consecutivă replicării, activează răspunsul SOS (jos). Proteina Rec A se leagă de ADN m.c. în regiunea opusă breșei; funcția sa proteolitică este activată și represorul Lex A este clivat. Genele *lex A* sint reperate și, în consecință, proteina Lex A este sintetizată în cantitate mare. Ea este însă clivată cît timp proteina Rec A este activată de ADN m.c. Cînd reparația ADN s-a terminat, Rec A nu mai clivează represorul și proteina Lex A, nou sintetizată, se leagă din nou de operatori. Celula revine astfel la starea neindusă (după Howard—Flanders, 1981).

șelor. Se produce un semnal inductor („inducing signal”) care activează reversibil funcția de protează specifică a proteinei *Rec A*, inducînd răspunsul „SOS”. Nu se cunoaște exact mecanismul activării proteinei *Rec A* *in vivo*.

In vitro, activarea *Rec A* are loc cînd se formează un complex ternar Rec A — ADN m.c. — nucleozid trifosfat (Roberts și colab., 1982). În acord cu aceste date, pare rațional ca și *in vivo* regiunile de ADN m.c.

produse prin tratamentul care induce răspunsul SOS să reprezinte cel puțin o parte din semnalul inductor al răspunsului „SOS” (Walker, 1984). Proteina *Rec A* activată clivează represorul *Lex A* la nivelul unei legături peptidice — alanină—glicocol — în două subunități inactive, eliberând de represie genele controlate de el. În absența represorului funcțional, genele *uvr A*, *uvr B*, *rec A*, *Lex A* și celelalte deblocate sintetizează cu o viteză crescută produșii corespunzători. Se sintetizează cantități mărite de proteină *Rec A*, care se leagă de regiunile de ADN m.c. rămase încă libere și apoi de regiunile adiacente. Se sintetizează de asemenea, cantități mari de proteină *Lex A*, care este însă clivată imediat după ce este sintetizată. Faptul că proteina *Lex A* este clivată de *Rec A* mult mai rapid decât este clivat represorul λ demonstrează că represorul *Lex A* este substratul primar al acțiunii proteinei *Rec A* (Howard-Flanders, 1981).

Inițial sint deblocate genele ai căror operatori s-au legat relativ slab de proteina *Lex A*. Dacă tratamentul inductor este suficient de puternic, sint activate mai multe molecule de *Rec A* și clivate, de asemenea, mai multe molecule de *Lex A*. Pe măsură ce rezerva de represor *Lex A* scade la nivele foarte joase, sint exprimate la nivelul lor maxim chiar funcțiile genelor ale căror secvențe operator au legat-o strins. Prin acest mecanism de derepresie se realizează inducția sistemului de reparație „SOS” care asigură fie creșterea disponibilului de enzime de reparație prin excizie și resinteză, fie deschiderea căii de reparație postreplicativă (fig. 126).

Ca urmare, în timp ce o celulă normală de *E. coli* conține 10—20 de molecule de enzime, codificate de gena *uvr A*, după inducția „SOS”, numărul lor crește foarte mult, asigurând excizia eficientă a unui număr mare de dimeri. Deși procesul indus este mai lent, celulele supraviețuiesc la mai multe mii de leziuni ale ADN. Pe măsură ce leziunile moleculei de ADN sint reparate, și structura dublu catenară este restabilită, semnalul inductor diminuează și apoi este eliminat. Moleculele *Rec A* revin la starea proteolitică inactivă.

În absența proteazei *Rec A*, proteina *Lex A* nu mai este clivată, iar sinteza sa continuă, ducând la refacerea rezervei celulare. Procesul este însoțit de legarea represorului *Lex A* de genele sistemului „SOS” și de blocarea activității lor, cu revenirea la starea normală, neindusă. După Walker (1984), deși elementele fundamentale ale acestui model de reglare, prezentat sintetic în fig. 127, par să fie bine stabilite, este probabil că în viitorul apropiat va fi determinat și rolul altor gene adiționale, precum și unele subtilități în reglarea lor.

Particularitățile procesului reparator „SOS”

Activitatea de reparație SOS face parte dintr-un ansamblu de funcții celulare (funcțiile „SOS”) induse în celulele care prezintă leziuni ale ADN ce nu pot fi reparate de enzimele constitutive sau care blochează replicarea. Aceste funcții au ca scop să permită celulei să supraviețuiască, cu toată prezența numeroaselor leziuni, măbind capacitățile acesteia de reparație, de recombinare și de mutageneză. Funcțiile „SOS” — foarte complexe — se exprimă ca un grup de funcții inductibile, metabolic diferite, incluzând capacitatea de a repara dimerii de pirimidină, inducția litică a diferiți profagi, întârzierea diviziunii celulare etc., dar reglate coordonat, fapt care demonstrează caracterul de proces unitar.

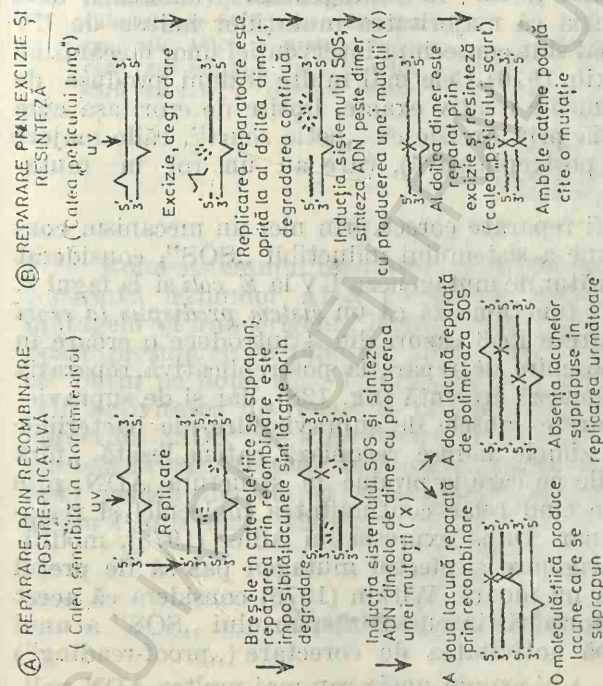
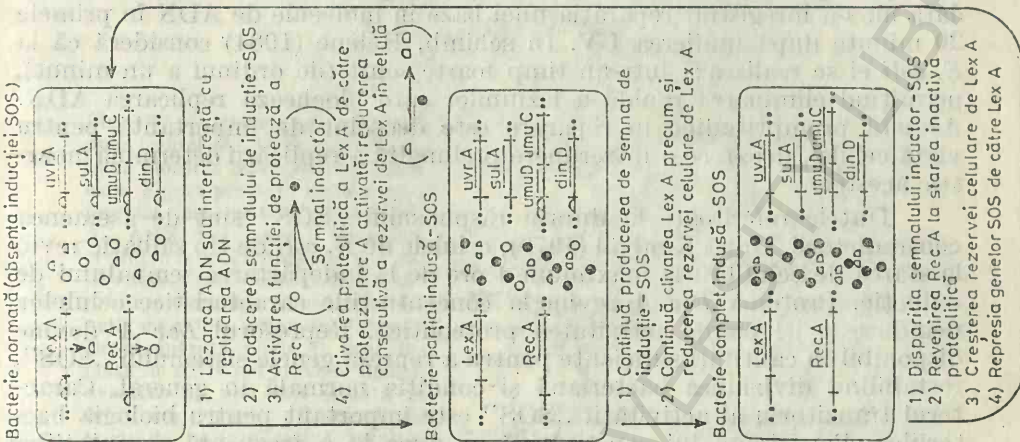


Fig. 126. — Căile posibile de reparație predispușă la erori (A, B.) a ADN lezat prin iradiere cu UV a *E. coli*. Linile groase corespund catenelor-ficce produse în cursul primei replicări consecutive; liniile ondulate — catenele de ADN parental iradiat; liniile ondulate — ADN polimerizat în cursul replicării repa-
ratorii; X — mutație (după Witkin, 1976).

Fig. 127. — Modelul molecular de ansamblu al sistemului de reglare SOS (după Walker, 1984). Cercurile albe — molecula de proteină RecA proteolitic inactivă; cercurile negre — RecA proteolitic activă; semicercurile — molecule de LexA; sferturile de cerc — molecule de LexA clivate prin proteoliză (după Walker, 1984).

După unele date mai vechi, răspunsul „SOS” era considerat ca un răspuns relativ întârziat, datorită necesității acumulării proteinelor active prin inducție. Astfel, după Eyfjörd și colab. (1975), timpul minim pentru inducția reparației SOS este de ~20 minute, pornind de la faptul că nicio dată nu s-a înregistrat reparația unei baze în molecule de ADN în primele 20 minute după iradierea UV. În schimb, Hélène (1984) consideră că la *E. coli* el se realizează într-un timp foarte scurt (de ordinul a un minut), permițând eliminarea rapidă a leziunilor care blochează replicarea ADN. Această promptitudine în reparare este deosebit de importantă pentru viața celulei, deoarece o întrerupere prelungită a replicării determină moartea acesteia.

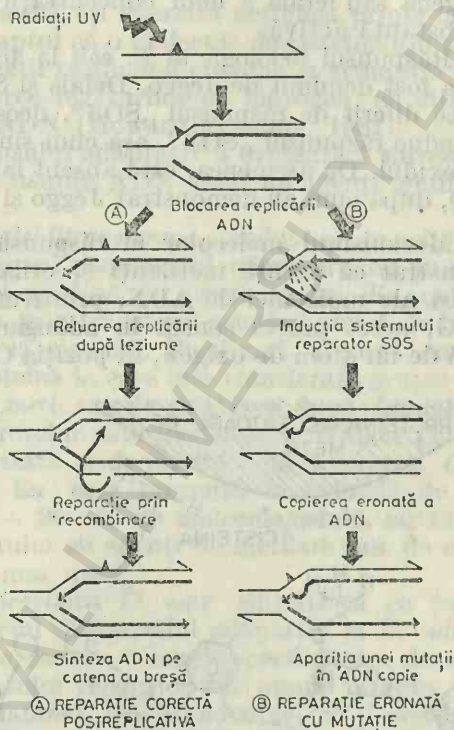
Datele referitoare la durata răspunsului „SOS” sînt de asemenea contradictorii. După Kimball (1979), celulele de *E. coli* de tip sălbatic revin la starea de echilibru la maximum 4 ore de la îndepărtarea semnalului de inducție. Proteina *Rec A* revine la concentrațiile caracteristice celulelor neinduse și își pierde activitatea proteolitică. Represorul *Lex A* devine disponibil în cantități suficiente pentru a represa genele sistemului „SOS”, restabilind diviziunea bacteriană și condiția normală în general. Caracterul tranzitoriu al activității „SOS” este important pentru biologia bacteriilor. Persistența lui constitutivă ar duce la o frecvență a mutațiilor incompatibilă cu nivelele admise ca limite normale și cu supraviețuirea.

Rolul sistemului reparator „SOS” în mutageneză. Numeroase date experimentale permit concluzia că majoritatea mutațiilor induse de UV la *E. coli* și unii dintre fagii săi sînt consecința intervenției unor mecanisme incorecte de reparație (Witkin, 1976). Cele mai multe leziuni produse de UV sînt reparate prin mecanisme relativ exacte, lipsite de erori așa cum sînt fotoreactivarea, reparația prin excizie cu „petic scurt”, căile majore de replicare prin recombinare postreplicativă), care au un rol în mutagenеза UV.

Leziunile care nu pot fi reparate corect prin nici un mecanism constitutiv devin ținta de acțiune a sistemului inductibil „SOS”, considerat în prezent ca integral răspunzător de mutagenеза UV la *E. coli* și la fagul λ . Sistemul de reparație „SOS” funcționează ca un sistem predispus la erori („error-prone system”), deoarece în 3 cazuri din 4 introduce o eroare în molecula de ADN. Spre deosebire de reparația postreplicativă, reparația „SOS” se însoțește de mutagenезă crescută (fig. 128), dar și de supraviețuire, deoarece mutațiile măresc șansele de supraviețuire ale bacteriilor de tip sălbatic iradiate. Enzimele induse recopiază catena lezată, „fără să se preocupe” de anomaliiile pe care le produc în structura ADN, prin încorporarea de baze greșite cînd refac continuitatea moleculei și restabilesc caracterul dublu catenar. După expresia lui Adler (1978), modificarea informației genetice originare și efectul mutagen par să fie prețul plătit de celulă pentru ca să nu moară. Witkin (1976) considera că acest efect ar putea fi rezultatul formării în cursul răspunsului „SOS” a unui cofactor proteic, care inhibă activitatea de corectare („proof-reading”) exercitată de exonucleaza 3' → 5' asupra uneia sau mai multor ADN polimeraze constitutive sau a unei ADN polimeraze mai puțin dependente de modelul ADN. Linn și colab. (1980) au arătat că răspunsul „SOS”

induce formarea unei ADN polimeraze „predispusă la erori”, mult mai tolerantă la mutații, capabilă să replice ADN, respectind cu mai puțină strictețe regulile de legare a bazelor decât ADN polimeraza normală.

Fig. 128. — Iradierea cu UV produce leziuni ale ADN, care determină blocarea bifurcației de replicare. Figura prezintă două soluții posibile ale acestei probleme: A. ADN pol „sare” leziunea, creind în fața ei o breșă de ~ 1000 de baze, care este „umplută” printr-un schimb de material genetic cu catena originară intactă. Breșa apărută poate fi ușor închisă de ADN pol și ADN ligază, deoarece nu mai este situată în fața unei leziuni. Procesul de reparație postreplicativă rezultă corespunzător unei diluări a numărului de leziuni per moleculă de ADN. B. Menținerea blocării bifurcației de replicare induce funcțiile celulare SOS, care realizează reparația ADN cu prețul producerii unei mutații, datorită replicării eronate a regiunii lezate.



Rolul sistemului reparator „SOS” este mult discutat și în raport cu repararea leziunilor ADN produse la organismele superioare de agenți mutageni și cancerigeni. Extrapolind datele demonstrate la *E. coli* se poate presupune că funcțiile „SOS” ar putea fi implicate în oncogeneză cel puțin pe două căi: 1) prin inducția unui virus oncogen latent și 2) prin activitatea de reparație predispusă la erori. Capacitatea sistemului inductibil „SOS” de a crește frecvența mutagenezei și a inducției fașilor etc. stă la baza testelor bacteriene (Mutatest, Inductest, „SOS” Chromotest) pentru detectarea substanțelor mutagene și/sau cancerigene din mediu (Gottesman, 1981).

Răspunsul reparator adaptativ

Samson și Cairns (1977) au descris un mecanism nou de reparare a leziunilor ADN produse de agenți de metilare sau de etilare. Acest răspuns apare în urma expunerii prelungite a *E. coli* la concentrații mici ale unor

substanțe mutagene, foarte active, ca, de exemplu, *N*-metil-*N'*-nitro-nitrozoguanidina (MNNG) sau etilmetansulfonatul. Datorită acestui mecanism reparator, celulele de *E. coli* cultivate timp de două ore în medii de cultură care conțin 1 μg de MNNG/ml devin extrem de rezistente față de acțiunea mutagenă sau letală a unor concentrații de cîteva sute de ori mai mari de substanță activă.

Răspunsul fiziologic al *E. coli* la acțiunea agenților metilanți și etilanți a fost denumit de Jeggo, Defais și Samson (1977) *răspuns adaptativ*. El este diferit de răspunsul „SOS”, deoarece nu este produs de agenții care induc răspunsul „SOS”, așa cum sînt radiațiile UV sau 4-nitrocholin-1-oxidul. De asemenea, este absent la mutantele rec A^- (def) și *lex A* (*ind^-*), după cum au demonstrat Jeggo și colab. (1981).

Mecanismul molecular al răspunsului adaptativ. Experimental s-a demonstrat că agenții metilanți și etilanți produc leziuni în numeroase situsuri ale moleculei de ADN, printr-un proces de alchilare*. În cazul MNNG, acest proces constă în adăugarea unei grupări metil ($-\text{CH}_3$) egată de un atom de oxigen, în poziția C_6 a guaninei (fig. 129).

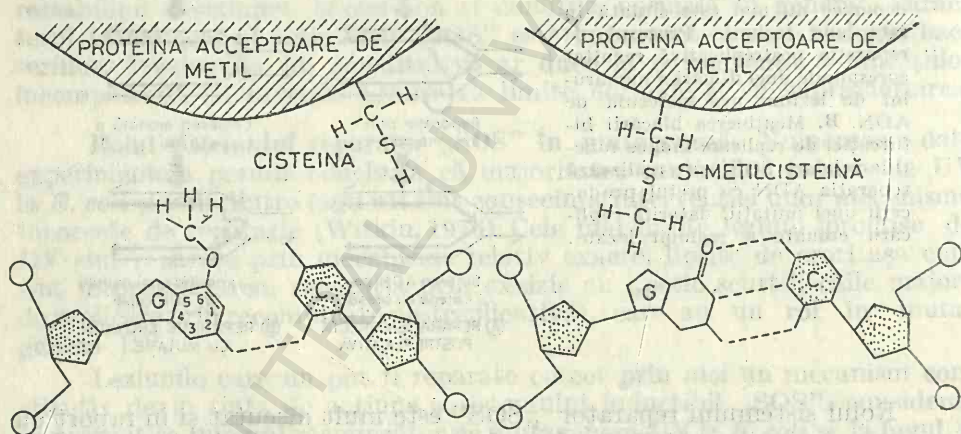


Fig. 129. — Reparația prin răspuns adaptativ. Lezarea unei catene a ADN prin adăugarea unei grupări metil și a unui atom de oxigen în poziția C_6 a guaninei, de către MNNG, este reparată prin acțiunea unei proteine acceptor de metil, sintetizată în perioada de adaptare. Aceasta preia gruparea CH_3 , restabilind structura inițială a guaninei (după Howard-Flanders, 1981).

Formarea leziunii potențial mutagene O^6 -alchilguanină este însoțită de ruperea legăturii de hidrogen care leagă guanina metilată de citozina de pe catena opusă. Gruparea metil astfel inserată proemină în „adîncitura” mare a moleculei de ADN dublu helical. Producerea de leziuni de tipul O^6 -metilguanină pune probleme deosebit de grave celulei, deoarece poate genera mutații prin împerechere greșită în cursul replicării. Procesul reparator este dependent de sinteza de proteine *de novo* în cursul perioadei de adaptare, cînd celula este expusă la o concentrație mică de agenți de metilare sau de etilare.

* Alchilarea = grefarea unei grupări alchil (ca de exemplu metil, etil etc.), provenită de la o halogenură, pe un atom de carbon, azot sau oxigen.

Foote și colab. (1980), precum și Olson și Lindahl (1980) au arătat că *in vitro* sub acțiunea extractelor de celule „adaptate” procesul reparator constă în îndepărtarea grupării metil de la guanină și transferul ei la restul aminoacidului cisteină. din structura unei proteine. Această proteină, numită *proteina acceptoare de metil*, își exercită acțiunea printr-un proces de demetilare, determinat de faptul că o moleculă de cisteină din structura sa acționează ca acceptor de metil readucând guanina la structura sa originală, fapt care permite refacerea legăturilor de hidrogen, cu citozina de pe catena complementară a ADN (Howard-Flanders, 1981).

Studiul biochimiei răspunsului adaptativ a evidențiat sinteza indusă a două enzime care acționează asupra ADN lezat de agenți metilanți sau etilanți (Walker, 1984):

1) *O⁶-alchilguanin-ADN-alchiltransferaza* produs al genei *ada*, sintetizată în cantitate mare în cursul răspunsului adaptativ, cu un rol esențial în prevenirea mutagenezei produsă de acești agenți. Ea catalizează îndepărtarea leziunii mutagene, prin transferul grupării alchil de la *O⁶-metilguanină* sau *O⁶-etilguanină* la cisteină. Purificată, această enzimă s-a dovedit a fi în același timp proteina la care este transferată gruparea metil sau etil (*proteina acceptoare de metil sau de etil*). Deși după Lindahl (1982) funcția enzimatică a acestei proteine este discutabilă, Walker (1984) consideră că ea poate fi caracterizată și denumită — fără a greși *O⁶-alchilguanin-ADN-alchiltransferaza*. Ea este prezentă în celulele de *E. coli* „neadaptate” în cantitate de ~ 20—60 de molecule/celulă, iar în celulele „adaptate” în urma tratamentului cu agenți de metilare sau de etilare în cantități de 100—200 de ori mai mari.

2) *3-metiladenin-ADN-glicozilaza II* este sintetizată ca produs al genei structurale *alk A*, în cursul răspunsului adaptativ la *E. coli* (Evenson și Seeberg, 1982). *In vitro* ea are o largă specificitate de substrat, putând acționa în cursul procesului reparator nu numai asupra 3-metiladeninei, ci și asupra 3-metilguaninei, 7-metiladeninei și 7-metilguaninei din structura ADN metilat (Karran și Lindahl, 1982). Ea funcționează deci ca o enzimă cu rol important în prevenirea morții celulare și în îndepărtarea unor leziuni premutagene, diferite de *O⁶-alchilguanină*. Procesul reparator adaptativ are o capacitate de acțiune limitată în timp, deoarece durează numai una sau două ore. În cursul acestei perioade nivelul de mutageneză și moarte celulară consecutiv acțiunii substanțelor mutagene de metilare sau de etilare este mult mai mic decât cel care caracterizează microorganismele ce nu au suferit adaptarea. El are și o capacitate limitată de acțiune la nivel molecular: după ce un aminoacid (cisteina) din structura *O⁶-alchilguanin-ADN-alchiltransferazei* (proteina acceptoare de metil) a preluat o grupare $-CH_3$, devenind S-metileisteină, capacitatea reparatoare a proteinei este epuizată (Howard-Flanders, 1981; Walker, 1984).

Semnificația biologică a sistemelor de reparație a ADN

Dezvoltarea unei sau mai multor strategii de răspuns la lezarea materialului genetic (fig. 130) în cursul evoluției, de către toate sistemele biologice, nu reprezintă un fenomen surprinzător. Organismele vii trăiesc

într-un mediu în care sînt expuse frecvent acţiunii unor agenţi fizici sau chimici ce pot afecta structura ADN. Arhitectura moleculară a ADN conferă acestuia nu numai o remarcabilă stabilitate, factor esenţial pentru asigurarea menţinerii neschimbate a speciilor de-a lungul unui număr

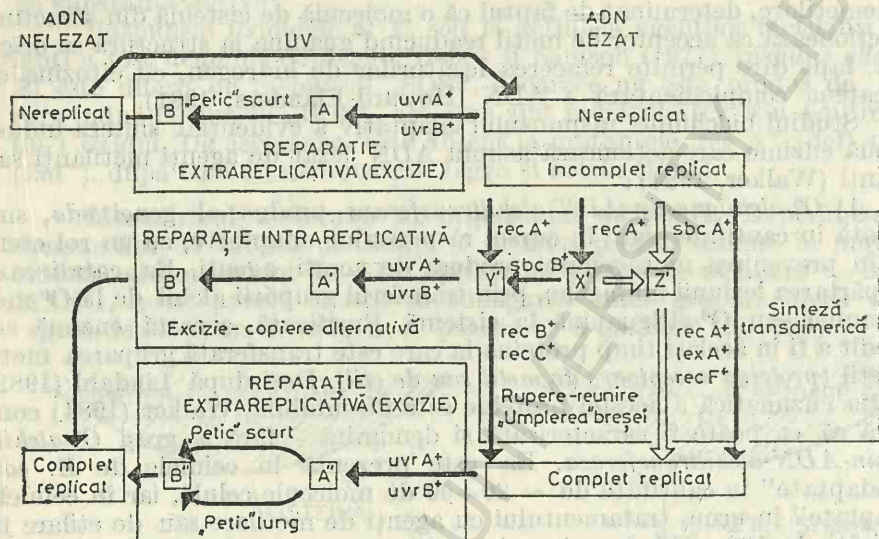


Fig. 130. — Reprezentarea schematică a căilor posibile de reparare a ADN la *E. coli*. Pentru simplificare, s-a presupus că leziunea este rezultatul iradierii cu UV. Se prezintă cele două căi fundamentale, intra- și extrareplicativă. Ultima poate avea loc fie înainte ca regiunea lezată să încerce să se replice (sus), fie după ce bifurcația de replicare a trecut prin regiunea lezată, lăsind o breșă, în catena nou sintetizată opusă dimerului (incomplet replicată). Dacă breșa poate fi „umplută” de unul din procesele de reparare prin recombinare, notate în dreapta figurii, repararea postreplicativă poate îndepărta dimerul (jos). Literele A și B se referă la clasele de intermediari de excizie, iar literele X, Y și Z, la intermediarii de recombinare care conțin dimeri. Sinteza transdimerică are loc cînd capacitatea de corectare a ADN polimerazei este inhibată, astfel încît lipsa legării prin hidrogen a dimerilor nu reprezintă o barieră pentru replicare și nu lasă o breșă opusă dimerului (modificat după Clark și Volkert, 1978).

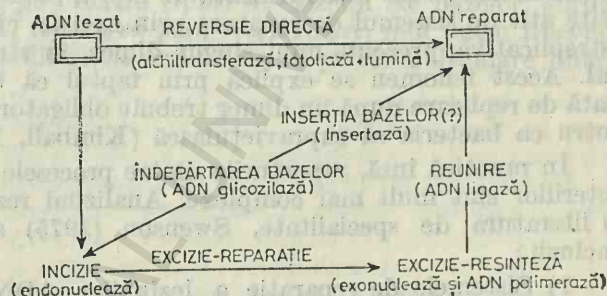
enorm de generații, ci și o structură capabilă să asigure diferitele sale funcții ca replicarea, transcrierea, recombinarea și repararea etc. După Novick și Szilard (1949), în mod normal, o genă bacteriană poate fi replicată de peste o sută de milioane de ori, înainte de a avea o șansă de 50% de a fi alterată prin mutație. Aceasta cu toate că organismele vii au o foarte mare sensibilitate, spre exemplu, față de radiațiile UV și X, ca rezultat al interacțiunii dintre energia cu mare putere de penetrație și materialul genetic. Kondo (1964, 1975) a arătat că numărul leziunilor necesare pentru inactivarea unui genom cu radiații UV sau X crește pe măsură ce crește complexitatea genomului.

Importanța proceselor reparatoare este legată de două aspecte esențiale pentru organismele vii: 1) pe de o parte, ele sînt avantajoase într-un mediu advers care produce mutații cu o frecvență mare, pentru menținerea stabilității genetice a organismelor; 2) pe de altă parte, datorită faptului că nu sînt totdeauna perfecte și eficiente ele permit apariția

unor evenimente mutagene, esențiale pentru evoluția biologică. Dacă procesele de reparare a ADN ar fi perfecte și eficiente totdeauna, ele ar reduce frecvența naturală a mutațiilor la un nivel atât de scăzut, încât populațiile de organisme ar fi în incapacitate de a mai evolua. După Howard-Flanders (1981), este probabil că și mecanismele de reparare genetică ar fi ele înșile supuse presiunii selecției. Rata evoluției unei specii ar putea fi cuplată cu capacitatea de discriminare a sistemelor de reparare a ADN și cu eficiența cu care acestea lucrează. În felul acesta, „capacitatea organismelor vii de a se restabili după ce au fost lezate apare ca o caracteristică dramatică a lor” (Hanawalt, 1975), dar datorită imperfecțiunii cu care se realizează uneori, ea reprezintă și una din căile care asigură diversitatea lumii vii.

Rolul proceselor reparatoare în cursul metabolismului normal. Celulele bacteriene beneficiază de o serie de procese reparatoare (fig. 131) — mai puțin cunoscute la nivel molecular — chiar în cazul activității lor

Fig. 131. — Reprezentarea schematică a interrelațiilor dintre principalele căi de reparare a leziunilor ADN, prezente la bacterii. Călea de inserție a bazelor, ca o ramificație posibilă a mecanismului de excizie reparatorie, este singura controversată (după Paterson și Gentner, 1985).



normale, când nu sînt expuse unor agenți de tipul radiațiilor UV sau a altor agenți capabili să producă leziuni ale ADN. Astfel, Pauling și Hanawalt (1965), studiind procesele de reparare asociate cu replicarea bacteriilor, au ajuns la concluzia că transcrierea genetică (concomitent cu replicarea la bacterii) poate introduce în structura ADN incizii („nicks”) monocatenare reparabile. În lipsa timinei din mediu, necesară pentru efectuarea procesului reparator, aceste breșe se acumulează, dacă procesul de transcriere continuă. Gross, Grunstein și Witkin (1971) au emis ipoteza că prezența ADN polimerazei I sau a unui sistem de recombinare (*rec⁺*) funcțional intact sînt absolut necesare pentru supraviețuirea bacteriilor normale. Nakayama și Hanawalt (1972) au confirmat una din aceste afirmații, demonstrînd că repararea inciziilor monocatenare din structura ADN la mutantele *pol A⁻* este mult mai lentă decît în celulele parentale *pol A⁺*. Aceasta demonstrează, după ei, că ADN polimeraza I este implicată în repararea inciziilor monocatenare din structura ADN.

Pe baza unor date experimentale, Grivell și Hanawalt (1972) apreciază că nivelul de reparare sau de turnover al ADN în celulele de *E. coli* care cresc normal implică o înlocuire a ~0,1% din ADN parental per generație. Acest nivel este mai scăzut în celulele în care transcrierea și sinteza de ARN sînt inhibitate. În sfîrșit, Brutlag și Kornberg (1972) au atras atenția asupra rolului esențial al ADN polimerazei I versatile care

realizează un fel de reparație cu funcție de „control de calitate”. Datorită activității sale exonucleazice 3'→5', ea îndepărtează nucleotidele împerecheate greșit la extremitatea 3'—OH a catenei de ADN care crește. Prin acest mecanism ea exercită un rol de revizie („editing”) *in vivo*, corectînd erorile de împerechere a bazelor, ce se produc în cursul replicării normale.

Procesele reparatoare și moartea celulelor bacteriene. Funcția majoră a sistemelor de reparație este de a elimina leziunile potențial letale, asigurînd astfel protecția bacteriilor față de efectele grave ale agenților care produc modificări în structura ADN. O dovadă o constituie faptul că tulpinile de *E. coli* lipsite de capacitatea de reparație prin excizie supraviețuiesc mult mai puțin după expunerea la radiații UV, în comparație cu cele de tip sălbatic, care dispun de un sistem reparator normal. Cu toate acestea, ele supraviețuiesc, după Bridges și Munson (1968), suficient pentru ca unele bacterii cu dimeri de pirimidine în ADN să continue să se dividă. Ei conchid că dimerii de pirimidină nu sînt leziuni necondiționat letale, dar că mai mult decît probabil ele devin letale dacă nu sînt excizate. O dovadă în acest sens este furnizată de faptul că la bacteriile *uvr⁻*, *rec A⁻* lipsite atît de sistemul de reparare prin excizie, cît și de cel de replicare postreplicativă, prezența unui singur dimer, în structura ADN, are efect letal. Acest fenomen se explică prin faptul că breșa (discontinuitatea) lăsată de replicare după un dimer trebuie obligatoriu închisă („astupată”), pentru ca bacteria să supraviețuiască (Kimball, 1977).

În practică însă, raporturile dintre procesele reparatoare și moartea bacteriilor sînt mult mai complexe. Analizînd rezultatele proprii și cele din literatura de specialitate, Swenson (1975) ajunge la următoarele concluzii :

1) Sistemele de reparație a leziunilor ADN au efecte protectoare majore, care favorizează supraviețuirea după tratamentul cu agenți mutageni foarte diferiți.

2) Mutațiile letale induse nu contribuie în mod apreciabil la moartea celulelor bacteriene, chiar după tratamentul cu diferiți agenți mutageni. Este evident că ele apar la bacterii, dar obișnuit frecvența lor este prea mică pentru a avea, asupra supraviețuirii acestora, un efect care poate fi măsurat cu tehnicile standard actuale. O probă că mutațiile letale nu sînt o cauză majoră a morții bacteriilor este furnizată de absența sau slaba relație între frecvența mutațiilor și posibilitatea morții. Astfel, tulpinile de *E. coli ex^r* sînt foarte sensibile față de sfîrșitul letal, dar sînt, în esență, rezistente față de efectul mutagen al UV. La *Haemophilus influenzae*, situația este diferită : expunerea la hidrazină produce mutații cu o mare frecvență, dar este lipsită de efect letal. În schimb, expunerea la metilmetan-sulfonat (MMS) omoară foarte multe celule, fără să producă mutații detectabile (Kimball și Hirsch, 1975 ; Kimball, 1977).

3) Căile prin care leziunile ADN nereparate pot determina moartea celulelor bacteriene sînt foarte puțin cunoscute. În multe cazuri sînt foarte complexe și indirecte. Astfel, moartea bacteriilor sub acțiunea radiațiilor UV s-ar putea produce pe cel puțin douăsprezece căi (Swenson, 1975 ; Kimball, 1977).

Evoluția sistemelor de reparație a ADN

După Sagan (1973), principala sursă de energie care a contribuit la formarea ADN primitiv, capabil de replicare, au fost radiațiile ultraviolete solare, a căror intensitate a fost de câteva mii de ori mai mare decât în prezent, datorită particularităților fizicochimice ale atmosferei primitive. Primele organisme primitive care au dobândit caracterul de rezistență față de UV (UV^R) au avut un mare avantaj față de celelalte și au devenit strămoșul comun al tuturor organismelor actuale. Gena *phr* a apărut în molecula ADN ca o structură foarte avantajoasă pentru evoluție.

Ca urmare, *reparația prin fotoreactivare* a fost probabil primul mecanism reparator apărut. Această particularitate explică, probabil, și gradul cel mai înalt de răspindire în natură, în raport cu celelalte mecanisme, *Reparația prin excizia leziunii*, este, de asemenea, foarte răspândită, fiind prezentă la fagii T-par, la bacterii, ca și la organismele eucariote inferioare și superioare (inclusiv la om) (Kondo, 1975). Este absentă la *Chlamydomonas reinhardtii* și în culturi celulare de la rozătoare (Swinton și Hanawalt, 1973). Este activă pe diferite tipuri de leziuni ale bazelor purinice și pirimidinice. În sfârșit, *repararea prin recombinare*, mai puțin frecventă genotipic, se realizează la diferitele organisme vii pe căi moleculare diferite (Kondo, 1975).

Codul genetic

„Codul genetic este o piatră de hotar majoră pe drumul lung al biologiei moleculare”.

F. H. C. CRICK

Codul genetic reprezintă ansamblul regulilor și principiilor în acord cu care informația genetică codificată în ADN (sau în ARN în cazul special al unor virusuri) este „transcrisă” pentru a fi transmisă de la locul său de origine (genomul) la dispozitivele care fac sinteza proteinelor în celulă, precum și cu modul în care mesajul „transcris” poate fi „citit” și „tradus” în secvențe specifice de aminoacizi. Funcția codului genetic poate fi asemănată, în ultimă instanță, cu procesul de transmitere a unei informații codificate de la „sursă” (structura biochimică a genomului), pe anumite „canale”, la locul de „recepție” unde mesajul este decodificat (tradus) și folosit, în cazul activităților celulare, în procesul de biosinteză a proteinelor: ea constă în conservarea criptografică a informației și transmiterea ei de la sursă (genomul) la receptorul reprezentat de structurile cu funcții efectoare care sînt ribosomii. Analogia cu schemele de transmitere a informației în general este evidentă. Moleculele de ADN poartă deci în structura lor un adevărat cod molecular submicroscopic a cărui semnificație este determinată de succesiunea specifică a celor patru baze * (A, T, C, G) și a cărei complexitate este proporțională cu mărimea genomului purtător de informație **.

Pentru explicarea teoriei codului genetic se recurge de obicei la analogia cu un limbaj, care urmează a fi transcris în alt limbaj. Codul genetic reprezintă nu numai mesajul însuși, înscris în genom, ci și „dicționarul bilingv” necesar „traducerii” limbajului ADN, prin intermediul ARN, în limbajul de 20 de litere al proteinelor.

Principalele caracteristici ale codului genetic. Crick (1968), sintetizînd rezultatele cercetărilor asupra codului genetic, a prezentat următoarele particularități cu caracter general: 1) informația genetică este înscrisă în ARNm cu 4 baze (A, U, G, C); 2) fiecare unitate de codificare (codon) este o tripletă de baze; 3) sînt utilizați numai 20 din numeroșii aminoacizi

* Deși unitatea de bază a acizilor nucleici este nucleotidul, „literele” uzuale de cod sînt cele care corespund denumirii prescurtate a bazelor, deoarece ceilalți doi constituenți — pentoza și fosfatul — sînt identici la toate nucleotidele.

** Complexitatea mesajului genetic variază între 5 375 litere în cazul fagului ΦX 174, și 5 miliarde de litere, la om. După calculele aproximative ale lui Beadle (1958), 5 miliarde de litere corespund unei cantități de informație echivalentă cu 1 miliard 700 de milioane de cuvinte cu trei litere, ceea ce reprezintă 600 mii de pagini de tipar sau 1 000 de volume obișnuite, cu circa 500 de cuvinte engleze pe o pagină.

posibili; 4) codul genetic este „degenerat” și universal; 5) cei 20 de aminoacizi nu sînt distribuiți la întîmplare între cele 64 de triplete. Impresia generală este că aminoacizii „înrudiți” au, în oarecare măsură, codoni înrudiți (Epstein, 1966).

Examinarea „dicționarului” codului genetic permite deducerea cîtorva reguli: a) codonii XYU și XYC codifică totdeauna același aminoacid; b) codonii XYA și XYG codifică adesea același aminoacid. Triptofanul și metionina, care au fiecare un singur codon, fac excepție de la această regulă; c) în cele mai multe cazuri, codonii pentru același aminoacid încep cu aceeași pereche de baze, cu excepția codonilor pentru leucină, serină și arginină. În cele ce urmează vom detalia cîteva din aceste particularități generale.

Structura codului genetic

Codul triplet. Structura codului genetic este determinată de secvența specifică a celor 4 baze (ATCG) cu care se pot face 4^n permutări (n = numărul de nucleotide dintr-o moleculă dată), ceea ce permite codificarea unui număr enorm de mesaje genetice. Ca atare, numărul posibil de gene cu o greutate moleculară de 10^6 dal alcătuite din 1 500 nucleotide este de $\sim 4^{1500}$, ceea ce reprezintă o valoare cu mult mai mare decît numărul de gene care au existat în toate genomurile de la apariția vieții și pînă în prezent (Watson, 1974). Bazele se repetă deci de-a lungul moleculei de ADN, așa cum se repetă literele unui alfabet de-a lungul frazelor unei cărți, în tot felul de combinații. După cum ordinea literelor dă sensul unui text, ordinea particulară a bazelor determină semnificația moleculei de ADN.

După descrierea structurii ADN de către Watson și Crick (1953), problema cea mai importantă a fost cea a modalității de asociere a celor patru baze, pentru ca fiecare combinație să conțină informația corespunzătoare legării unuia din cei 20 de aminoacizi în constituția proteinelor. Presupunînd că toate unitățile fundamentale de codificare, denumite *codoni*, au aceeași lungime, Gamow (1954) a emis cel dintîi ipoteza că cea mai scurtă secvență nucleotidică necesară pentru a codifica un aminoacid constă din 3 baze (*cod triplet*). Într-adevăr, dacă unui aminoacid i-ar corespunde un singur nucleotid (*cod singlet*) nu ar fi posibilă decît codificarea a 4 aminoacizi. Un *cod dublet*, în care un aminoacid ar fi specificat de un codon alcătuit din două nucleotide, nu ar putea codifica decît 4^2 , adică 16 aminoacizi. Codul triplet permite formarea a 64 de cuvinte (4^3), reprezentînd forma cea mai simplă care asigură codificarea celor 20 de aminoacizi naturali. Grupurile de 4 și de 5 nucleotide într-un codon sînt excluse, deoarece corespund la 256, respectiv 1 204 cuvinte de cod, ceea ce ar reprezenta o redundanță excesivă. Masa moleculară a unui codon (tripletă de nucleotide) este de $\sim 1\,000$ dal în ARNm (m.c.) și respectiv de $\sim 2\,000$ dal în ADN dublu helical. În sprijinul existenței codului triplet, pe lîngă datele de calcul matematic, au fost aduse argumente genetice și biochimice (fig. 132).

Date genetice în favoarea realității codului triplet. Natura tripletă a codului genetic a fost demonstrată de Crick (1961), cu ajutorul mutațiilor induse la fagul T4, la nivelul unui cistron al regiunii rII, descrisă de Benzer (1962). Mutațiile în această regiune a genomului fagic pot fi detec-

Codon = literă unică (cod „singlet”) (4 cuvinte)	Codon = două litere (cod „doublet”) (16 cuvinte)	Codon = trei litere (cod „triplet”) (64 cuvinte)
A	AA AG AC AU	AAA AAG AAC AAU
G	GA GG GC GU	AGA AGG AGC AGU
C	CA CG CC CU	ACA ACG ACC ACU
U	UA UG UC UU	AUA AUG AUC AUU
		GAA GAC GAC GAU
		GGA GGG GGC GGU
		GCA GCG GCC GCU
		GUA GUG GUC GUU
		CAA CAG CAC CAU
		CGA CGG CGC CGU
		CCA CCG CCC CCU
		CUA CUG CUC CUU
		UAA UAG UAC UAU
		UGA UGG UGC UGU
		UCA UCG UCC UCU
		UUA UUG UUC UUU

Fig. 132. — Natura obligatorie a codului genetic triplet poate fi dedusă din necesitatea existenței a minimum 20 de cuvinte de cod, corespunzând celor 20 de aminoacizi naturali.

tate prin variații de formă, mărime sau ale vitezei de creștere a plajelor de liză produse pe suprafața unei culturi de *E. coli* K 12, pe medii de cultură solidificate. Utilizarea coloranților de acridină (proflavină, acridin-oranj etc.) permite producerea de modificări ale moleculei de ADN, conștind fie din adiiție (adăugarea unei baze noi), fie din deleție (suprimarea uneia din bazele existente), ceea ce are ca rezultat apariția unor mutante « + » sau « — », în funcție de tipul de modificare. Studiul mutantelor fagice obținute după infecția *E. coli* K 12 a arătat că o mutație prin adiiție « + » perturbă citirea mesajului genetic, deoarece deplasează cadrul de lectură a informației genetice cu o literă la dreapta situsului de inserție. La aceste mutante, prin modificarea cadrului de lectură („frame shift mutation”), mesajul genetic este defazat, citirea este profund perturbată și are ca rezultat producerea unei proteine alterate, nefuncționale, datorită legării unor aminoacizi „răi”. Rezultatul este același pentru mutantele « — » prin deleție, care produc, de asemenea, o modificare a cadrului de lectură, de data aceasta cu o literă la stînga situsului mutației (fig. 133).

O combinație de mutații « + » și « — » readuce lectura mesajului în „faza normală”, dincolo de situsul ultimei mutații. Dacă distanța dintre cele două mutații nu este prea mare, funcția de tip sălbatic poate fi restabilită. Numai puțini aminoacizi încorporați vor fi „răi” și ca atare prezența lor, uneori, nu afectează semnificativ structura și funcția proteinei. Pe măsură ce distanța dintre deleție și adiiție crește, șansele de a obține o proteină normală scad. Mutantele duble, prin adiiție « ++ » sau prin deleție « -- », mențin fenotipul mutant. În schimb, la mutantele triple « +++ » sau « --- », la care s-au adăugat sau care au pierdut trei baze, numărul total al acestora rămîne multiplu de 3. În acest caz, mesajul

genetic defazat („out of phase”) până la sediul ultimei mutații, redobîndește cadrul de lectură normal, dincolo de acesta. Efectul asupra proteinei codificate este în funcție de distanța dintre mutații, respectiv de mărimea secvenței afectate (fig. 134).

Fig. 133. — Efectul inserțiilor, delețiilor și al combinării lor asupra „citirii” unei catene nucleotidice ca triplete — codoni — de la stînga la dreapta. Deoarece inserțiile sau delețiile afectează un număr de codoni situați dincolo de cel care poartă mutația, aceste modificări sînt considerate mutații ale cadrului de citire (după Strickberger, 1976).

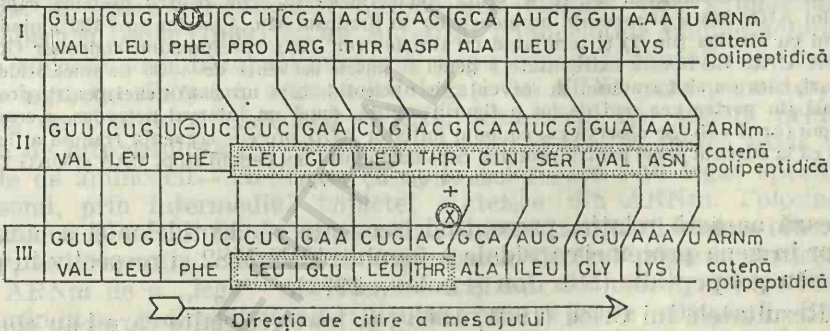
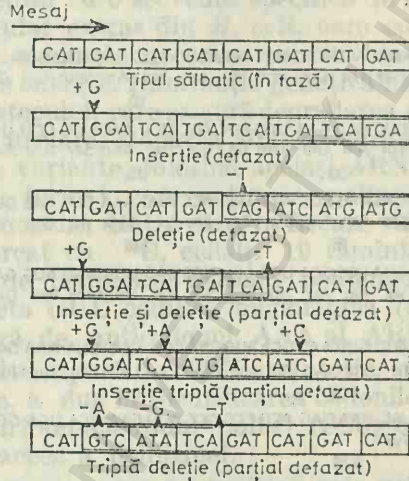


Fig. 134. — Consecințele modificării cadrului de citire a mesajului genetic. I. Corespondența normală dintre ARNm și catena polipeptidică. Linile verticale marchează cadrul de citire. II. Deleția unui nucleotid (incercuit) deplasează cadrul de citire, producînd o proteină modificată. Datorită caracterului degenerat al codului genetic, aminoacidul fenilalanină nu este modificat, deoarece poate fi codificat de UUU și UUC; ceilalți aminoacizi sînt total diferiți față de normal. III. Adăugarea unei a doua mutații cu sens opus « + » readuce cadrul de citire la normal. Cu excepția regiunii cuprinse între cele două mutații, secvența aminoacizilor este din nou normală.

În mod similar se comportă mutantele triple prin adăugare care suferă trei mutații prin deleție: mesajul genetic se restabilește dincolo de locul unde s-a produs ultima adăugare sau deleție.

Date biochimice în favoarea realității codului triplet. Primele studii de biochimie care pledează pentru existența codului triplet au fost de ordin cantitativ. Spre exemplu, virusul satelit al necrozei tutunului are o

proteină capsidală de 400 de aminoacizi, căreia îi corespund 1 200 de nucleotide în genomul său ARN. Date mai exacte au fost furnizate de tehnicile de secvențializare a acizilor nucleici și a proteinelor, care au permis stabilirea unor corespondențe riguroase între succesiunea codonilor în acizii nucleici și a aminoacizilor corespunzători în lanțul polipeptidic. Fig. 135

			(G)			AUA GAG CCC UCA ACC GGA GUU UGA AGC AUG		
GCU•UCU•AAC•UUU•ACU•CAG•UUC•GUU•CUC•GUC•GAC•AAU•GGC•GGA•ACU•GGC•GAC•GUG•ACU•GUC•GCC•CCA•AGC•AAC•UUC•			Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val AspAsn Gly Gly Thr Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Set Asn Phe					
1	5	10	15	20	25			
GCU AAC GGG GUC GCU GAA UGG AUC AGC UCU AAC UCG CGU UCA CAG GCU UAC AAA GUA ACC UGU ACG GUU CGU CAG			Ala Asn Gly Val Ala Glu Thp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val Arg Gln					
30	35	40	45	50				
AGC UCU GCG CAG AAU CGC AAA UAC ACC AUC AAA GUC GAG GUG CCU AAA GUG GCA ACC CAG ACU UUU GGU GGU GUA			Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val					
55	60	65	70	75				
GAG CUU CCU GUAGCC GCA UGG CGU UCG UAC UUA AAU AUG GAA CUA ACC AUU CCA AUU UUC GCU ACG AAU UCC GAC			Glu Leu, Pro Val Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala Thr Asn Ser Asp					
80	85	90	95	100				
UGC GAG CUU AUU GUU AAG GCA AUG CAA GGU CUC CUA AAA GAU GGA AAC CCG AUU CCC UCA GCA AUC GCA GCA AAC			Cys, Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn					
105	110	115	120	125				
UGC GGC AUC UAC UAA UAG ACG CCG GCC AUU CAA ACA UGA GGA UUA CCC AUG UCG AAG ACA ACA AAG AAG (U)			Ser Gly Ile Tyr Ser Lys Thr Thr Lys Lys					
129			1	5				

Fig. 135. — Corespondența dintre secvența nucleotidelor în gena pentru proteina capsidală a fagului ARN MS 2 și secvența aminoacizilor în produsul său. Proteina are 129 aminoacizi, începând cu alanina (nr. 1) și terminând cu tirozina (nr. 129), corespunzând codonilor GCU și respectiv UAC. La fiecare extremitate a genei se găsesc secvențe de ~ 30 de nucleotide, sau mai mari, care nu sînt traduse. În secvența de nucleotide care urmează genei pentru proteina capsidală (în partea cea mai de jos a figurii) există, după un interval netradus, o secvență de codoni (nr. 1—6). Se observă că, codonul inițiator AUG precede secvența tradusă a fiecărei gene și că la sfîrșitul genei pentru proteina capsidală există doi codoni stop, UAA și UAG (după Min Jou și colab., 1972).

ilustrează această relație, prezentînd secvența nucleotidelor și a aminoacizilor în gena proteinei capsidale a fagului ARN MS2 și respectiv în produsul său polipeptidic (Min Jou și colab., 1972).

Rezultatele lui Crick (1961, 1963), și toate celelalte care l-au confirmat, demonstrează, pe de o parte, existența codului triplet și, pe de altă, absența de intervale sau spații între codoni, deoarece citirea informației genetice se face neîntrerupt, codon după codon, începînd de la o extremitate a cistronului pînă la cealaltă.

Descifrarea codului genetic

Descifrarea codului genetic înseamnă stabilirea modului în care un limbaj bazat pe patru „litere” (A, T, C, G) poate alcătui un cod de 20 de cuvinte, corespunzînd celor 20 de aminoacizi naturali din structura proteinelor care, la rîndul lor, pot fi definite printr-un limbaj redat prin

20 de litere diferite. Codul genetic reprezintă, prin urmare, nu numai mesajul însuși înscris în genom, ci și „dicționarul” necesar „traducerii” limbajului de patru litere al ADN, în limbajul de 20 de litere al proteinelor.

Utilizarea mesagerilor sintetici. Nirenberg și Matthaei (1961, 1964) au realizat prima descifrare a codului genetic, demonstrând că o anumită secvență de ARN produce un polipeptid cu o secvență specifică de aminoacizi. Ei au utilizat un sistem acelar extras din *E. coli*, care conținea ribosomi, setul complet de ARNt, enzimele necesare pentru biosinteza proteinelor, Mg^{2+} și ATP, ca sursă de energie. Informația genetică naturală a fost suprimată prin incubarea amestecului, care asigură degradarea ARNm natural, (cu „viață scurtă”) și, ca urmare, stoparea sintezei proteinelor. Experiența a fost repetată în 20 de variante, folosind același ARNm sintetic — acidul poliuridilic (poli-U), format sub acțiunea polinucleotid fosforilazei * și setul complet de aminoacizi, dintre care, în fiecare variantă, numai un singur aminoacid era marcat cu ^{14}C , ceilalți 19 rămânând nemarcați. S-a obținut un singur tip de polipeptid marcat, polifenilalanina (poli-U), ceea ce demonstra că tripleta UUU codifică fenilalanina (respectiv codonul UUU din ARNm se leagă de anticodonul AAA al ARNt^{phe}).

Repetarea experiențelor cu alte tipuri de ARNm sintetic, diferite sub raportul compoziției lor în baze, a dus la identificarea codonilor specifici pentru alți aminoacizi: poliribonucleotidul poli-C (CCC) codifică sinteza poliprolinei, iar poli-A pe aceea a polilizinei.

Stabilirea secvenței bazelor într-un codon s-a realizat prin utilizarea *testului de legare a ribosomilor* („ribosomes binding test”), imaginat de Nirenberg și Leder (1969). Ei au sintetizat trinucleotide chimic definite — cu o succesiune a bazelor cunoscută și au cercetat capacitatea acestora de a lega, de ribosomi, aminoacizii legați de ARNt corespunzător, sub formă de complexe aminoacil-ARNt. Amestecul era trecut printr-un filtru de nitroceluloză care reținea ribosomii și lăsa să treacă toate moleculele de aminoacil-ARNt, cu excepția celor care s-au legat specific de ribosomi, prin intermediul tripletei sintetice din ARNm. Folosindu-se amestecuri ale celor 20 de aminoacizi, dintre care unul singur era radioactiv, se determina cu precizie capacitatea fiecărei triplete nucleotidice din ARNm de a „lega” de ribosomi aminoacidul corespunzător marcat, măsurându-se radioactivitatea filtrului care reținuse ribosomii. S-a demonstrat astfel, că tripleta GUU codifica valina, UGU cisteina, iar UUG leucina. Folosind ARNm sintetic, având toate cele 64 de aranjamente posibile, Nirenberg și colab. (1966) au demonstrat că 61, din cele 64 triplete de cod, au rol în specificarea celor 20 de aminoacizi naturali, în timp ce trei codoni au fost caracterizați ca „nonsens”, deoarece nu au rol în codificarea unui aminoacid. Ansamblul codonilor care specifică setul de aminoacizi standard, împreună cu codonii de punctuație (start și stop), formează dicționarul codului genetic (tabelul nr. 20).

* Polinucleotid fosforilaza, prezentă probabil numai la bacterii, catalizează legarea într-un polimer a oricăruia dintre cele 4 tipuri de monomere diferite (ADP, GDP, CDP și UDP), fără nevoia existenței unei molecule „template” (matriță). În consecință, polimerul nu are o secvență specifică de baze, compoziția sa reflectând de regulă concentrația precursorilor în mediu. Probabil că este nefuncțională în celula vie intactă (Grunberg-Manago, 1955, 1974).

Tabelul nr. 20

Codul genetic. Semnificația diferiților codoni în structura ARN și ADN.

ADN ARN	ADN ARN	ADN ARN	ADN ARN	Abrevierea	Semnificația
AAA UUU } phe	AGA UCU	ATA UAU } tyr	ACA UGU } cys	A	adenină
AAG UUC }	AGG UCC }	ATG UAC }	ACG UGC }	T	timină
AAT UUA } leu	AGT UCA	ATT UAA ochre	ACT UGA opal	C	citozină
AAC UUG }	AGC UCG }	ATC UAG amber	ACC UGG trp	G	guanină
				U	uracil
				ala	alanină
GAA CUU } leu	GGA CCU	GTA CAU } his	GCA CGU } arg	arg	arginină
GAG CUC }	GGG CCC }	GTG CAC }	GCG CGC }	asn	asparagină
GAT CUA }	GGT CCA }	GTT CAA }	GCT CGA }	asp	acid aspartic
GAC CUG }	GGC CCG }	GTC CAG }	GCC CGG }	cys	cisteină
				glu	acid glutamic
				gln	glutamină
TAA AUU } ileu	TGA ACU	TTA AAU } asn	TCA AGU } ser	gly	glicocol
TAG AUC }	TGG ACC }	TTG AAC }	TCC AGC }	his	histidină
TAT AUA }	TGT ACA }	TTT AAA } lys	TCT AGA }	ileu	izoleucină
TAC AUG met	TCC ACG }	TTC AAG }	TCC AGG }	leucina	leucină
				lys	lizină
				met	metionină
CAA GUU } val	CGA GCU	CTA GAU } asp	CCA GGU } gly	phe	fenilalanină
CAG GUC }	CGG GCC }	CTG GAC }	CCG GGC }	pro	prolină
CAT GUA }	CGT GCA }	CTT GAA }	CCT GGA }	ser	serină
CAC GUG }	CGC GCG }	CTC GAG }	CCC GGG }	thr	treonină
				trp	triptofan
				tyr	tirozină
				val	valină
				ochre	
				amber	
				opal	
					codoni „stop”

Utilizarea copolimerilor sintetici cu secvență cunoscută. (Poliribonucleotidele cu secvență cunoscută, folosite ca ARNm în sisteme acelulare de sinteză proteică, au fost folosite cu rezultate deosebite în determinarea semnificației codonilor. Secvența (UC)n poate fi citită ca UCU—CUC, UCU, CUC și determină formarea unui polipeptid care conține doi aminoacizi, serina și leucina. Prin aceeași tehnică s-a testat capacitatea de codificare a unor tri- și tetranucleotide, urmărind natura aminoacizilor încorporați în polipeptide (tabelul nr. 21).

Codul genetic propus a fost confirmat și în experiențe efectuate *in vivo*, care au marele avantaj de a furniza date legate de celula întreagă. Date semnificative au fost furnizate de asemenea de studiul proteinelor bacteriene și virale, în care poziția aminoacizilor a fost determinată prin tehnici biochimice și apoi corelată cu cercetările de genetică sau cu secvența nucleotidelor. Astfel, Yanofsky și colab. (1964) au demonstrat că mutațiile la nivelul locusului triptofan sintetazei se corelează riguros cu modificări specifice ale aminoacizilor în proteina A a enzimei. Rezultate similare a furnizat studiul genelor și proteinelor fagului ARN MS2 al *E. coli*. Determinarea exactă a secvenței celor 129 de aminoacizi din proteina capsidă și a celor 387 de nucleotide ale genei respective a demonstrat,

Tabelul nr. 21

Încorporarea aminoacizilor în sistemele acelulare cu răspuns la poliribonucleotidele sintetice cu secvență cunoscută

Secvența repetată	Codonii în poliribonucleotid	Aminoacizii încorporați
UC	UCU, CUC	Ser, Leu
AG	AGA, GAG	Arg, Glu
UG	UGU, GUG	Cys, Val
AC	ACA, CAC	Thr, His
UUC	UUC, UCU, CUU	Phe, Ser, Leu
AAG	AAG, AGA, GAA	Lys, Arg, Glu
GAU	GAU, AUG, UGA	Asp, Met
GUA	GUA, UAG, AGU	Val, Ser
UAC	UAC, ACU, CUA	Tyr, Thr, Leu
UAUC	UAU, GUA, UGU, AUG	Tyr, Leu, Ser, Ile
UUAC	UUA, CUL, ACU, UAC	Leu, Thr, Tyr

între altele, existența unei corespondențe exacte între fiecare aminoacid și codonii corespunzători (Min Jou și colab., 1972), conform dicționarului codului genetic (fig. 136).

A doua bază U		A treia bază			
		U	C	A	G
Prima bază	U	phe	phe	leu	leu
	C	leu	leu	leu	leu
	A	ile	ile	ile	met
	G	val	val	val	val

A doua bază C		A treia bază			
		U	C	A	G
Prima bază	U	ser	ser	ser	ser
	C	pro	pro	pro	pro
	A	thr	thr	thr	thr
	G	ala	ala	ala	

A doua bază A		A treia bază			
		U	C	A	G
Prima bază	U	tyr	tyr	ocre	amb
	C	his	his	gln	gln
	A	asn	asn	lys	lys
	G	asp	asp	glu	glu

A doua bază G		A treia bază			
		U	C	A	G
Prima bază	U	cys	cys	azur	trp
	C	arg	arg	arg	arg
	A	ser	ser	arg	arg
	G	gly	gly	gly	gly

■ HIDROFABI □ AMBIVALENȚI □ BAZICI ȘI HIDROFILI ■ ACIZI ȘI HIDROFILI

Fig. 136. — „Dicționarul” codului genetic, evidențiind regularitățile existente în structura sa.

Codul genetic este „nesuprapus”. Pe baza a diferite considerente de ordin fizicochimic, Gamow (1954) a presupus că în structura codului genetic ar fi posibilă „suprapunerea” („overlapping”) unor codoni, astfel încît o bază din structura unui codon ar putea intra în componența mai multor codoni adiacenți (fig. 137).

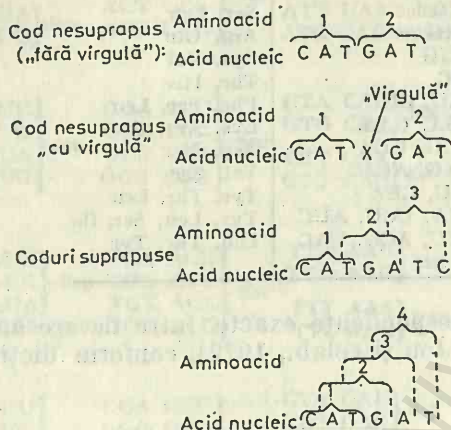


Fig. 137. — Exemple de cod genetic triplet fără suprapunere („nonoverlapping”) și cu suprapunere („overlapping”) (după Strickberger, 1976).

Acest tip de structură ar permite o economie semnificativă de material genetic. Prin acest fenomen, spre exemplu, secvența TACTACTAC, fără suprapunere între codoni, ar da trei cuvinte de cod identice (TAC, TAC, TAC). În cazul suprapunerii unei baze, două cuvinte de cod (TAC, CTA, ACT, TAC), iar în cazul suprapunerii a două baze formează șapte cuvinte (TAC, ACT, CTA, TAC, ACT, CTA, TAC). Deși are o mai mare capacitate de codificare, cum rezultă și din exemplul citat, codul „suprapus” introduce o serie de restricții, care îl fac practic inutilizabil. Astfel, suprapunerea implică succesiunea unui aminoacid dat, numai de către anumiți aminoacizi. Or, examinarea a numeroase proteine a demonstrat absența oricărei restricții în succesiunea aminoacizilor componenți, precum și existența unei relații de colinearitate între informația genetică și structura polipeptidului codificat. În cazul codului genetic suprapus, schimbarea prin mutație a unei baze, cum ar fi citozina din prima tripletă a secvenței citate, ar modifica trei codoni, și nu unul singur, ceea ce ar avea ca urmare încorporarea greșită a trei aminoacizi. Numeroase exemple au infirmat acest fenomen. În cazul mutațiilor induse cu acid nitros, alterarea unei singure baze din structura ARN de la virusul mozaicului tutunului determină modificarea unui singur aminoacid în proteina sintetizată sub controlul genei mutante. În sfârșit, într-un cod triplet care are o bază suprapusă, datorită faptului că ultima bază a unui cuvint de cod dat determină automat prima bază a celui următor, numărul aminoacizilor diferiți care pot fi legați succesiv este restrîns la 16. În mod similar, în cazul suprapunerii a două baze, ele determină primele două baze ale tripletei următoare și reduc numărul aminoacizilor care pot fi codificați la 4. Absența acestor restricții pledează împotriva ipotezei codului „suprapus”.

Prin urmare, codul genetic este nesuprapus („nonoverlapping”), în sensul că un grup de trei nucleotide adiacente alcătuiesc un codon și determină legarea unui anumit aminoacid în lanțul polipeptidic. Bazele din structura fiecărui codon nu sînt implicate în nici un fel în semnificația de cod a tripletelor precedente sau următoare.

„Ambiguitatea” codului genetic. Teoretic, codonii „ambigui” au proprietatea de a specifica mai mult de un aminoacid, deoarece ar fi recunoscuți de mai multe tipuri de ARN. Ambiguitatea ar putea fi determinată de trei cauze: 1) existența unor modificări în structura ARNt sau a ribosomilor; 2) recunoașterea și activarea greșită a unui aminoacid sau ARNt necorespunzător, de către aminoacil-ARNt sintetază; 3) citirea greșită a informației genetice în cursul traducerii, datorită interferenței unor factori de mediu cu procesul de recunoaștere codon-anticodon la nivelul complexului ARNt-ARNm-ribosom.

Primul și probabil singurul caz de ambiguitate a fost semnalat în experiențele efectuate de Nirenberg și Matthaei (1963) *in vitro*, utilizînd sisteme aceluare de sinteză proteică de la *E. coli*. Aceste experiențe au arătat că polimerul sintetic poli-U dirijează, pe lângă polimerizarea cu randament ridicat a fenilalaninei, și legarea unor mici cantități de leucină în polipeptidul predominant de tip polifenilalanină. Raportul dintre cei doi aminoacizi este de o moleculă de leucină la ~ 20–30 molecule de fenilalanină. Or, încorporarea anormală a leucinei, explicată inițial prin ambiguitatea codonului UUU, este datorită, așa cum s-a demonstrat ulterior, concentrației prea mari de Mg^{2+} , din experiențele respective. Alți factori, ca temperatura, prezența solvenților organici etc. pot influența legarea anormală a unui aminoacid de către un anumit codon. De aceea, este necesar ca experiențele *in vitro* să respecte cu rigurozitate condițiile existente *in vivo* (Chapeville și Haenni, 1974).

Concluzia este deci că *în condiții normale, un codon determină întotdeauna încorporarea aceluiași aminoacid, la toate organisme. Codul genetic este lipsit de ambiguitate sau este extrem de rar ambiguu.*

Caracterul „degenerat” al codului genetic. Descifrarea codului genetic a permis concluzia că din cele 64 de triplete posibile, 61 îndeplinesc funcția de codoni-sens, respectiv au semnificație în codificarea celor 20 de aminoacizi naturali. Caracterul „degenerat” al codului decurge din faptul că mai mulți codoni diferiți specifică un anumit aminoacid, așa cum într-un limbaj există mai multe cuvinte sinonime pentru aceeași noțiune (fig. 138). Codonii care specifică același aminoacid sînt numiți *codoni sinonimi* sau *codegenerați* (Icăș, 1969).

Caracterul „degenerat” al codului genetic nu este uniform. Din examinarea catalogului cuvintelor de cod rezultă că unii aminoacizi, ca de exemplu serina, arginina și leucina sînt codificați de cîte șase codoni, alanina, glicocolul, prolina, treonina și valina, de cîte patru, izoleucina, de trei codoni, iar alți nouă aminoacizi (asparagina, acidul aspartic, cisteina, acidul glutamic, glutamina, histidina, lizina, fenilalanina și tirozina), de cîte doi codoni. Numai doi aminoacizi, metionina și triptofanul, sînt codificați de un singur codon. Codonul AUG, pe lângă funcția de a specifica metionina, îndeplinește și rolul universal de codon inițiator. Deoarece aproape toți aminoacizii sînt codificați de mai mulți codoni,

Iăș (1969) consideră codul genetic ca fiind „înalt degenerat”. Caracterul „degenerat” nu reprezintă o imperfecțiune, deoarece nu apare ca întâmplător. Pe lângă faptul că nu este uniform, el prezintă o anumită regularitate care sugerează că este supus anumitor norme și că ar putea conferi

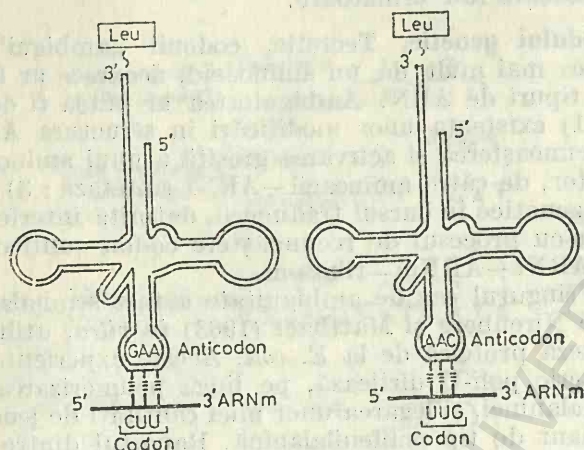


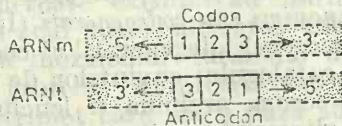
Fig. 138. — Schema a două molecule de ARNt, care leagă resturi de leucină. Fiecare recunoaște un cuvânt de cod diferit (după Watson, 1977).

unele avantaje biologice. Esențial este faptul că fiecare aminoacid este desemnat numai de codoni specifici, respectiv că nici un cuvânt de cod nu codifică mai mult de un aminoacid.

„Flexibilitatea” codului genetic. Efectul „wobble”. Ipoteza unei anumite flexibilități a codului genetic, cunoscută sub denumirea de efect „wobble”, a fost formulată de Crick (1966). Argumentul principal a fost furnizat de observația că toți codonii „sinonimi” (care codifică același aminoacid) au primele două baze ale tripletei constante, în timp ce a treia poate varia. Crick a ajuns la concluzia că recunoașterea codon—anticodon se face în mod riguros specific (A—U, C—G) în pozițiile 1 și 2 ale codonilor și în mod variabil (flexibil), la nivelul celui de-al treilea nucleotid situat în poziția „wobble” (engl. wobble = a oscila).

După cum rezultă din fig. 139, secvența nucleotidelor în codoni este scrisă în direcția 5' → 3', în timp ce, datorită polarității opuse, secvența, în anticodoni este scrisă în sens invers (3' → 5'). Datorită acestui fapt,

Fig. 139. — Reprezentarea schematică a relației dintre nucleotidele codonilor și anticodonilor, evidențiind polaritatea lor opusă. Primul și al doilea nucleotid al codonului sint „citiți” de al treilea, respectiv de al doilea nucleotid al anticodonului, în timp ce al treilea este citit („wobble”) de primul nucleotid al anticodonului (după Lagerkwist, 1980).



primul și al doilea nucleotid din codoni sint „citiți” prin formarea de legături de H de al treilea și respectiv al doilea nucleotid din anticodoni. Cel de-al treilea nucleotid din codon este citit de primul nucleotid al anticodonului. Poziția „wobble” corespunde deci celui de-al treilea nucleotid din codon și primului din anticodon.

Bazele moleculare ale efectului „wobble”. Fenomenul „wobble” s-ar datora faptului că interacțiunea inițială codon—anticodon, care are loc între nucleotidul nr. 1 al codonului și nucleotidul nr. 3 al anticodonului, ar fi urmată de o a doua interacțiune, între nucleotidele din mijloc. După ce s-au format aceste perechi de baze corecte în două poziții, în poziția a treia este permisă o oarecare „flexibilitate” în raport cu constrîngerile structurale. Ea este determinată de proprietățile speciale ca structură și rol în traducerea mesajului genetic a nucleotidului „wobble”, situat în poziția 1 (la capătul 5') al anticodonului. Astfel, s-a demonstrat că în timp ce nucleotidele 2 și 3 din anticodon sînt de tipul A, U, C și G, nucleotidul nr. 1 este frecvent reprezentat de inozină (derivat prin dezaminarea ade-

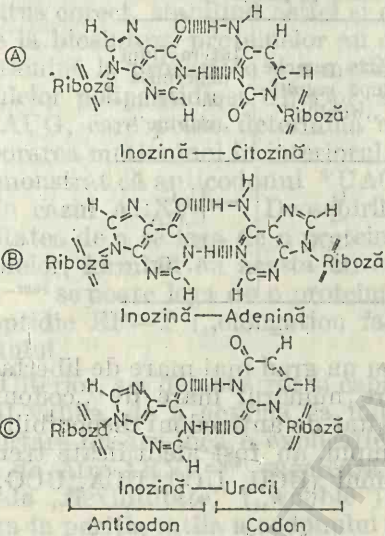
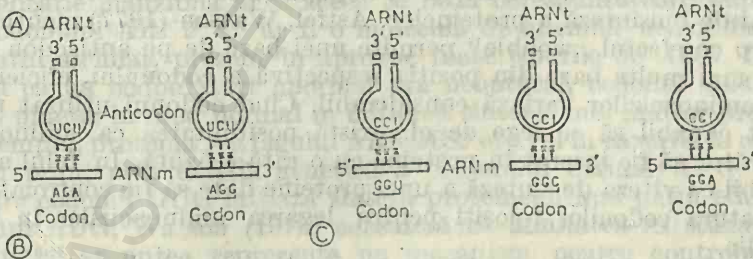


Fig. 140: — Efectul „wobble”. A. Împerechere normală în poziția „wobble”, I—C, B, C. Împerechere „wobble” I—A și I—U

Fig. 141. — Exemple ale efectului „wobble”. (A) În poziția a treia a codonului, U se poate lega cu A sau G; (B) I în aceeași poziție se poate lega cu U, C sau A. (C) Codonii AGA și AGG codifică arginina, în timp ce GGU, GGC și GGA codifică glicocolul (după Watson, 1977).



ninei). În mod normal, inozina se leagă de citozină, dar în poziția „wobble” ea poate lega uracilul sau adenina (fig. 140). Prin acest mecanism, un anumit ARNt poate recunoaște și se poate lega de mai mulți codoni care specifică același aminoacid (fig. 141).

Termenul „wobble” descrie deci un grad mai mare de libertate sterică pentru nucleotidele aflate în poziția respectivă care, interacționând, pot stabili legături de H, ce nu sînt posibile în celelalte două poziții ale codonului. Marea fidelitate a traducerii genetice este asigurată, pe de o parte, de faptul că primele două nucleotide ale codonului sînt „citite” de anticodon strict după regulile Watson și Crick (A—U, C—G) și, pe de altă, pentru că fenomenul „wobble” este supus anumitor restricții sintetizate de Crick (1966), în ipoteza sa. Ele includ o serie de reguli, reunite sub denumirea de *conceptul clasic de citire a codonilor* (tabelul nr. 22) (Lagerkvist, 1980).

Tabelul nr. 22

Regulile de citire a nucleotidelor în poziția „wobble”

Nucleotidul din poziția „wobble” pe anticodon	Baza pereche după regula Watson și Crick	Baza pereche după regulile „wobble”	Interacțiuni nepermise după regulile „wobble”
U	A	G	U, C
C	G	—	U, C, A
I	C	U, A	G
G	C	U	A, G

Citirea nucleotidelor „wobble” cu un grad mai mare de libertate este explicabilă și prin discrepanța dintre numărul mare de „codoni-sens” dintr-un cod degenerat și numărul limitat de anticodoni disponibili ca să-i „citească”. În cazul serinei, spre exemplu, au fost identificate trei tipuri de ARNt corespunzând celor șase codoni (UCU, UCC, UCA, UCG, AGU și AGC) (Watson, 1977).

Efectul „wobble” explică, în mare măsură, caracterul degenerat al codului genetic. Ceva mai mult, el ar acționa și ca un factor de reglare a procesului de biosinteză a proteinelor. Astfel, Watson (1977) menționează că în timp ce efectul „wobble” permite unei baze de pe anticodon să recunoască mai multe baze din poziția respectivă a codonului, eficiența de legare a aminoacizilor variază considerabil. Cînd codonul utilizat nu are un ARNt capabil să se lege de el, există posibilitatea ca aminoacidul corespunzător să fie inserat în proteină cu o rată scăzută. În felul acesta, ar fi posibil ca viteza de sinteză a unei proteine date să fie controlată parțial de natura codonilor folosiți pentru legarea aminoacizilor în lanțul polipeptidic.

Citirea informației genetice

Codul genetic este „fără virgule” („commaless”), ceea ce înseamnă că nu există nici un semn de punctuație sau semnal care să indice sfîrșitul unui codon sau începutul altuia. Cuvintele de cod trinucleotidice (triplete) au o polaritate sau direcție specifică (Nirenberg și Leder, 1961). Datorită acesteia, codonul GUU codifică valina, în timp ce UUG codifică leucina.

Cadrul de citire („reading frame”) a informației genetice trebuie stabilit cu rigurozitate la începutul unei molecule de ARNm și este marcat în mod normal prin prezența codonului AUG, care specifică formilmetionina la procariote și metionina la eucariote. Citirea codonilor sau decodificarea ARNm se face, după aceea, secvențial de la o tripletă la alta, într-o direcție specifică de-a lungul moleculei de ARNm, până întâlnește un codon „stop” (nonsens), care semnifică terminarea sintezei lanțului polipeptidic. Ea începe de la stînga (capătul 5' fosforilat al moleculei de ARNm), spre dreapta (corespunzînd grupării 3'—OH). Direcția de citire 5' → 3' a mesajului genetic din ARNm este aceeași ca și direcția de biosinteză a ADN și a ARN.

Codonii inițiatori. Citirea corectă a mesajului genetic este condiționată de existența unui semnal specific care indică inițierea, la nivelul unui situs corect, stabilind astfel și cadrul de citire adecvat. Studiile referitoare la biosinteza proteinelor au arătat prezența aminoacidului N-formilmetionină la procariote și a metioninei la eucariote, la începutul tuturor moleculelor polipeptidice. Ulterior, s-a demonstrat funcția dublă a codonului AUG, care poate determina atât inițierea mesajului genetic, cît și încorporarea metioninei în interiorul moleculei polipeptidice. Experimental s-a demonstrat că anticodonul ${}^3\text{UAC}^{5'}$ este identic, atât în cazul ARNt^{met} , cît și în cazul $\text{ARNt}^{\text{f-met}}$. Deosebirea decurge din faptul că $\text{ARNt}^{\text{f-met}}$ are capacitatea de a se lega de o proteină cu rol de *factor de inițiere* a sintezei proteinelor, formînd cu acesta un complex de inițiere 30S, în timp ce ARNt^{met} se poate lega de o proteină cu rol de *factor de creștere* a lanțului polipeptidic EF—T („elongation factor”) numai în cursul sintezei polipeptidului.

Ulterior, s-a demonstrat și capacitatea codonului GUG, care codifică normal valina, de a acționa ca inițiator al sintezei proteinelor. Această comportare nu are încă o explicație satisfăcătoare. Recunoașterea acestui codon de către $\text{ARNt}^{\text{f-met}}$ sugerează posibilitatea existenței unui tip particular de „flexibilitate” („wobble”) față de anticodonul f—met, de data aceasta în poziția întâia a codonului și nu în poziția a treia, cum precizează conceptul lui Crick, referitor la caracterul „wobble” al codului genetic. O explicație plauzibilă ar fi aceea că baza corespunzătoare din structura anticodonului $\text{ARNt}^{\text{f-met}}$ ar fi o moleculă de adenină nemodificată și nu derivatul alchilat, prezent în aproape toate tipurile de ADN. Considerat inițial ca un codon start anormal sau nenatural, codonul GUG funcționează practic în mod normal în inițierea sintezei mai multor proteine (ca, de exemplu, proteina A a fagului ARN MS2 etc.) și în cazurile în care devine codon prim, prin deleția genetică a codonului normal AUG. Deoarece *in vitro* codonul GUG inițiază sinteza proteinelor mai puțin eficient decît codonul AUG, Watson (1976) consideră că afinitatea sa scăzută pentru $\text{ARNt}^{\text{f-met}}$ ar putea reprezenta un mecanism pentru controlul ratei la care funcționează o genă dată.

Codonii „stop”. Cercetările referitoare la descifrarea codului genetic au dus la descoperirea a trei codoni (UAA, UAG și UGA), fără semnificație în codificarea aminoacizilor. De aceea au fost numiți inițial codoni fără sens („nonsens”). Ulterior s-a demonstrat că acești codoni au rolul

de codoni „stop” care indică prin prezența lor sfârșitul mesajului genetic și prin aceasta terminarea sintezei unui anumit polipeptid. Ei au primit denumirile de codoni *amber* (UAG), *ochre* (UAA) și *opal* (UGA), lipsite de o semnificație specială*.

Existența codonilor „stop” explică deosebirile remarcate în sinteza proteinelor *in vivo* și *in vitro* utilizând ca matriță polimeri sintetici. În timp ce în condiții naturale (în prezența ARNm natural), polipeptidul sintetizat este eliberat prin hidroliză enzimatică la capătul carboxiterminal ARNt, în cazul utilizării ARNm sintetic de tip poli-U, care nu conține codoni „stop”, polipeptidul nou format rămâne legat de ribosomi ca o moleculă de polifenilalanil-ARNt.

Spre deosebire de codonii-sens, codonii „stop” nu sînt „citiți” de molecule de ARNt speciale pentru terminarea sintezei polipeptidului, ci de proteine specifice denumite *factori de eliberare* („release factors”). Au fost descriși pînă în prezent doi factori de eliberare și anume, unul specific pentru codonii UAA și UAG și altul pentru codonii UAA și UGA.

Unele mutații pot determina întreruperea sintezei proteinelor cu toate consecințele sale negative prin conversia unui codon care specifică un anumit aminoacid, într-un codon „stop”. Astfel, codonii-sens UCG (serină), CAG (glutamină) și UAG sau UAC (tirozină) pot fi precursori mutaționali ai codonilor „stop”. Fiecare poate fi convertit la UAG prin modificarea unei singure baze. Tabelul nr. 23 prezintă sintetic semnificația diferiților termeni utilizați curent pentru a caracteriza particularitățile codului genetic.

Tabelul nr. 23

Definițiile termenilor utilizați în descrierea codului genetic (modificat după Strickberger, 1976)

Termenul	Semnificația	Termenul	Semnificația
Literă de cod	Nucleotid; A, T, G, C în ADN; A, U, G, C, în ARNm	Cod ambiguu	Cod în care un codon poate specifica mai mult de un aminoacid
Codon sau cuvînt de cod	Secvență de nucleotide, care specifică un aminoacid (ex. UUU = fenilalanina)	Cod fără virgulă („commaless code”)	Cod lipsit de nucleotide intermediare, cu rol de separare a cuvintelor de cod (ex. UUCCCC pentru doi aminoacizi într-un cod triplet nesuprăpus)
Anticodon	Secvență nucleotidică în ARNt, complementară codonului (AAA = anticodon pentru fenilalanina)	Cadru de citire („Reading frame”)	Secvență nucleotidică anumită, care începe într-un punct specific și este apoi citită secvențial, codon după codon, pînă se ajunge la codonul final

* Termenul *amber* a fost folosit inițial pentru a caracteriza o serie de mutații bacteriene non-sens descoperite de cercetătorul Bernstein (echivalentul german al termenului *amber* = chihlimbar). Termenii *ochre* (engl = ocru) și *opal* au fost adoptați ulterior, pornind de la premisa că „adesea este mai sigur să dai unei descoperiri o denumire inocentă decît una descriptivă speculativă”.

Tabelul nr. 23 (continuare)

Termenul	Semnificația	Termenul	Semnificația
Cod genetic sau dicționar de cod	Tabelul tuturor codonilor care specifică aminoacizii și semnalele „stop”		
Lungimea codonilor	Numărul literelor dintr-un cuvânt de cod (trei litere în codul triplet)	Mutație prin modificarea cadrului („Frame shift mutation)	Modificare în cadrul de citire a mesajului genetic, prin inserție sau deleție, prin care numărul nucleotidelor în secvență devine diferit de multiplu de 3 (lungimea codonului). Mutația modifică succesiunea normală a codonilor în cadrul de citire și produce o nouă secvență de codoni
Cod nesuprapus (Nonoverlapping code)	Cod în care numărul aminoacizilor codificați este egal cu numărul codonilor dispuși cap la cap, într-o secvență (ex. UU-UCCG = fenilalanină (UUU) + prolină (CCC))	Codon (cuvânt) sens	Codon care specifică un aminoacid prezent în mod normal într-o anumită poziție într-o proteină
Cod suprapus (Overlapping code)	Cod care codifică un număr de aminoacizi mai mare decât numărul codonilor prezenți puși cap la cap, într-o secvență (ex. UUUCCG = fenilalanină (UUU) + fenilalanină (UUC) + serină (UCC) + prolină (CCC))	Mutație cu sens greșit („Missense mutation)	Modificare în secvența nucleotidică, prin deleție, inserție sau substituție, având ca urmare producerea unui codon care specifică un aminoacid diferit într-o anumită proteină (ex.: UUU (fenilalanină) se schimbă la UGU (cisteină))
Cod nedegenerat	Cod care conține un singur codon pentru fiecare aminoacid (la 20 aminoacizi corespund 20 codoni)		
Cod degenerat	Cod care conține mai mulți codoni pentru un anumit aminoacid (UCU, UCC, UCA, UCG codifică serina). Numărul total al codonilor este mai mare decât al aminoacizilor	Mutație nonsens	Mutație ce determină apariția unui codon care nu specifică un aminoacid (ex. UAG codon „stop” determină stoparea sintezei polipeptidului sau de mutație „stop”)
Codoni sinonimi	Codoni diferiți, care specifică același aminoacid într-un cod degenerat (UCU = UCC = UCA = UCG = serină)	Universalitate	Utilizarea aceluiași cod genetic în toate organismele (ex. UUU = fenilalanina) la bacterii, șoarece, om și tutun)

Utilizarea preferențială a unor codoni. Faptul că cei mai mulți aminoacizi sint codificați de mai mult de un codon pune problema dacă codonii sinonimi sint folosiți cu frecvență egală sau dacă unii sint folosiți preferențial. Răspunsul a fost contradictoriu. După unii autori, deși o serie de codoni sint folosiți mai frecvent decât alții, aproape totdeauna aceste „preferințe” par să fie datorate întâmplării. Doolittle (1981) a remarcat existența unei corelații între procentul celor 20 de aminoacizi în proteine și numărul de codoni sinonimi pe care îi posedă fiecare în codul genetic (fig. 142).

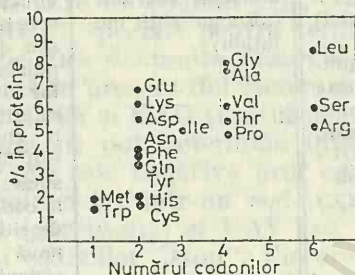


Fig. 142. — Procentajul prezenței celor 20 de aminoacizi în compoziția proteinelor bacteriene, comparat cu numărul codonilor sinonimi ai fiecăruia în codul genetic (după Doolittle, 1981).

Grantham (1981), studiind 131 de gene cu structura primară cunoscută, provenite de la grupe mari taxonomice, a ajuns la concluzia că în cadrul aceluiași organism toate genele cunoscute manifestă aceeași preferință pentru anumiți codoni sinonimi. Pe baza acestor preferințe a grupat în cinci clase (variabile ca omogenitate) genele aparținând virusurilor și diferitelor categorii de organisme: 1) genele umane și animale; 2) genele levurilor și ale amoebei „sociale” *Dictyostelium discoideum*; 3) genele bacteriene; 4) genele fungice; 5) genele virusurilor plantelor și ale animalelor. Cele 5 clase se deosebesc unele de altele prin utilizarea preferențială a anumitor codoni. Alegerea preferențială a codonilor ar putea rezulta dintr-o armonizare între compoziția în codoni a mesajelor genetice și ansamblul moleculelor de care dispune celula pentru a traduce aceste mesaje (în special frecvența diferiților ARNt). Din datele lui Grantham (1981) rezultă, de asemenea, că genele care corespund unor proteine puțin abundente în celulă aleg o strategie particulară de codificare, mai puțin eficace în cursul traducerii, realizând astfel un proces de armonizare globală a genomului, în favoarea celulei și deci a genomului.

Universalitatea codului genetic

Codul genetic este universal sau cel puțin în mare măsură universal, în sensul că aceleași unități de codificare — *codonii* — specifică aceiași aminoacizi la toate organismele. În sprijinul acestei concluzii teoretice au fost aduse o serie de fapte de observație și, în primul rând, cele din categoria „experiențelor himere”, care folosesc sisteme acelulare de sinteză a proteinelor, provenite de la o specie și ADN sau ARN provenit de la alta (Rose, 1976). Astfel, ARN genomic provenit de la virusul mozaicului tutunului produce aceeași secvență de aminoacizi nu numai în plantele de tutun, ci în orice altă plantă în care este activ. ADN SV40 produce proteine virale tipice în sisteme acelulare de *E. coli*, iar ARN din fagul Φ2 diri-

jează sinteza unei proteine capsidale virale normale, atât în extractele aceluare provenite de la gazda sa normală (*E. coli*), cit și în cele de *Euglena gracilis*, algă verde unicelulară (Herskowitz, 1977).

În mod similar, mesagerii sintetici determină încorporarea în polipeptide a aceluare aminoacizi, indiferent de natura și proveniența sistemului aceluare de sinteză proteică. Polimerii sintetici de tip „poli U” determină polimerizarea fenilalaninei, cei de tip „poli C” polimerizarea prolinei, iar cei de tip „poli A” asamblarea polipeptidului polizină în sisteme aceluare provenite de la bacterii (*E. coli*), amfibieni (*Xenopus laevis*) și mamifere (cobai). Van Ehrenstein și Lipmann (1961) au urmărit *in vitro* sinteza polipeptidelor din hemoglobină, utilizând ARNm din reticulocite de iepure și un sistem aceluare de sinteză proteică de la *E. coli*. Au fost obținute polipeptide tipice hemoglobinei de iepure, ceea ce demonstrează că ARNm provenit de la această specie conține codoni care specifică aceiași aminoacizi ca și cei de la *E. coli*. Experiențele *in vivo* au confirmat aceste date. Tulpinile F' de *E. coli*, care poartă operonul *lac* integrat în structura plasmidei F (F'—*lac*), transferă această plasmidă prin conjugare la *Serratia marcescens*, determinând biosinteza unei β -galactozidaze caracteristică pentru *E. coli*. În mod asemănător, plasmidele *E. coli*, care poartă determinanții genetici ai fosfatazei alcaline, transferate la *S. marcescens*, determină sinteza unei fosfataze cu structură tipică celei de la *E. coli*.

Universalitatea codului genetic sugerează nu numai o origine comună a vieții terestre, dar și imposibilitatea schimbării lui odată ce viața a dobândit un anumit grad de complexitate. Mutațiile care ar altera codul genetic determinând asocierea unor aminoacizi diferiți cu codonii modificate ar altera sinteza tuturor proteinelor și ar fi letale pentru celulă în cazul în care codonul respectiv ar fi tradus totdeauna eronat. Toate aceste date converg pentru a demonstra existența unui cod genetic comun tuturor organismelor, fără a exclude însă posibilitatea ca această universalitate să nu fie absolută, în sensul că în anumite privințe codul genetic ar putea fi diferit de la o specie la alta.

Abaterile de la caracterul universal al codului genetic. Deși caracterul universal al codului genetic părea definitiv stabilit (Crick, 1966; Watson, 1976), un număr important de lucrări au scos în evidență faptul că ADN mitocondrial (ADN mit) are un cod genetic diferit de cel al tuturor organismelor și chiar de la un organism la altul (Wallace, 1984). În primul rând, s-a demonstrat că datorită unei „citiri” speciale, mitocondriile utilizează un număr mai mic de ARNt decât cei 32 necesari în conformitate cu ipoteza „wobble” pentru traducerea informației genetice în citosol. Astfel, ADN mit uman și de șoarece codifică numai pentru 22 de molecule de ARNt (Bibb și colab., 1980), iar cel de la levuri pentru 24 de tipuri de ARNt (Bonitz și colab., 1980). Această reducere semnificativă a numărului de ARNt este explicabilă prin faptul că un singur ARNt recunoaște codonii CUN (leucină), GUN (valină), UCN (serină), CCN (prolină), ACN (treonină), GCN (alanină), CGN (arginină) și GGN (glicocol). În această enumerare, N poate fi reprezentat, în poziția a treia a codonului, de oricare din cele patru baze. Efectul „wobble” supus în citoplasmă unor norme restrictive prezintă în mitocondrii o „flexibilitate” mult mai mare, decurgind din faptul că un singur ARNt având un uracil ca primă „literă” în anti-

codonul său poate recunoaște o familie de patru codoni diferiți, care specifică același aminoacid, deoarece uracilul poate forma perechi cu oricare din cele patru baze (U, A, G și C). În schimb, în familiile de doi codoni, efectul „wobble” se supune aceluiași norme ca în citoplasma celulei.

În plus, Tzagaloff (1979) a descris cazul unor „codoni eretici” sau „disidenți”, care nu respectă codul genetic universal în sinteza proteică dirijată de ADN mit.

Deși aceste deosebiri sînt relativ puțin numeroase, ele sînt suficiente pentru ca ARNm mit să nu poată fi tradus în proteine decît în mitocondrii (Lebacqz, 1982). Între acestea cităm următoarele, cunoscute pînă în prezent :

1) La fungi și mamifere, triptofanul este codificat în ADN mit nu numai de tripleta normală UGG, ci și de codonul UGA, a cărui funcție în codul genetic este aceea de semnal de terminare a sintezei proteinelor (codonul stop „opal”).

2) În sinteza polipeptidelor citoplasmatiche, codonul inițiator AUG are și funcția de codificare a metioninei. În cazul mitocondriilor, metionina este codificată nu numai de codonul AUG, ci și de codonii AUA și probabil AUU, care semnifică normal izoleucina.

3) Codonii AGA și AGG care codifică arginina în citoplasmă funcționează în ADN mit cu rolul de codoni terminali („stop”).

Deși există multe particularități comune, codul genetic mitocondrial al fungilor și animalelor diferă în unele privințe. Astfel, familia codonilor CUN semnifică la levuri treonina în loc de leucină, ca în cazul ADN mit (Li și Tzagaloff, 1979) de la *Aspergillus* și de la mai multe specii de animale. ADN mit de la *Aspergillus* codifică 3 tipuri de ARNt pentru metionină, în timp ce la levuri sînt numai două, iar la om și șoarecē numai un singur tip. La plantele superioare, codul genetic al ADN mit este mult mai înrudit cu cel universal decît în cazul fungilor și al animalelor. Secvențializarea unor molecule de ADN mit a arătat că ele includ virtual toți codonii universali. Singura deviere de la codul universal este reprezentată de codul CGG, care codifică în ADN mit triptofanul, în loc de arginină.

Semnificația abaterilor de la codul universal. Deosebirile dintre codonii ADN mit și cei cromosomali sînt recent descoperite și, ca urmare, interpretarea existenței lor este pur ipotetică. Pentru unii cercetători, modificarea regulilor de recunoaștere a bazelor în poziția trei a codonului ar permite existența unui sistem de traducere mai simplu și codul mitocondrial ar putea fi mai primitiv sau ar fi rezultatul unei presiuni mai puternice a selecției, pentru a reduce mărimea ADN mit. Deoarece codul universal poate fi convertit direct în codul mitocondrial mai simplu, prin suprimarea modificării uridinei din poziția „wobble” a unor molecule de ARNt, Wallace (1984) consideră că, probabil, codul mitocondrial a evoluat din cel universal, prin eliminarea acestei constrîngerii. Această modificare s-a stabilizat ulterior, pentru că a permis deleția genelor ARNt, care a dus la reducerea mărimii genomului. După ce redundanța ARNt s-a diminuat au urmat modificări în regulile de recunoaștere ale codonilor ADN mit, prin simple aditii sau deleții ale genelor ARNt rămase. Aceste mutații s-au stabilizat deoarece au devenit avantajoase, prin faptul că minimalizează

efectele dăunătoare ale transferului accidental de ARNm între mitocondrii și citosol.

Variațiile codului genetic mitocondrial observate la diferite organisme sugerează că aceste modificări s-au stabilit în perioade de timp diferite în cursul evoluției ADN mit. În sprijinul acestui punct de vedere pledează două fapte de observație :

1) ADN mit de la plante utilizează codonul CGG (arginină) pentru a codifica triptofanul, în timp ce ADN mit din celulele animale și fungice folosesc codonii UGG și UGA, ceea ce demonstrează că aceste modificări au apărut după divergența dintre plante, pe de o parte, și animale și fungi pe de alta.

2) Moleculele de ADN mit din celulele animale și fungi se deosebesc, la rindul lor, prin utilizarea codonilor pentru arginină, leucină și izoleucină, modificări apărute după divergența dintre mitocondriile fungilor și cele ale celulelor animale.

Influența particularităților codului asupra utilizării informației genetice

Unele particularități ale *codului genetic*, în mod special caracterul „degenerat” și efectul „wobble”, creează avantaje evidente organismului și au apărut probabil pentru a minimaliza consecințele greșelilor de traducere ale mesajului genetic sau ale substituirilor mutagene (Watson, 1977).

Caracterul „degenerat” al codului genetic acționează efectiv ca un sistem tampon cu valoare pentru supraviețuire împotriva efectelor nocive ale mutațiilor. Dacă fiecare aminoacid ar fi codificat de un singur codon (din cei 64 posibili), 44 de codoni ar fi „non-sens”, iar mutațiile ar duce fie la terminarea precoce a sintezei polipeptidelor, fie la producerea unei proteine alterate. Din examinarea dicționarului codului genetic se observă ușor că în cazurile în care doi sau mai mulți codoni specifică același aminoacid, primele două litere ale tripletei sînt identice și numai cea de-a treia este diferită. Spre exemplu, arginina este codificată de șase codoni diferiți (CGU, CGC, CGA, CGG, AGA și AGG), care au primele două litere comune. În cazul în care codonul normal CGU este schimbat prin mutație la CGA, el permite incorporarea în polipeptid a aceluiași aminoacid, arginina. Practic, orice schimbare produsă prin mutație în poziția treia (CGC sau CGG) a primilor patru codoni nu modifică natura aminoacidului încorporat. Ceva mai mult, chiar o modificare în prima literă a codonului CGA și transformarea lui prin mutație în AGA semnifică același aminoacid, arginina. În felul acesta, mutația rămîne „tăcută” („silent mutation”), deoarece modificarea în structura genei este fără efect asupra produsului ei, care își păstrează structura și funcția nealterate.

Un alt exemplu este furnizat de codonul AGA (arginină), care modificat prin mutație la AAA specifică lizina, de asemenea un aminoacid bazic. În acest caz, de regulă, mutația nu produce modificări prea mari în proprietățile proteinelor.

Datorită caracterului degenerat și efectului „wobble”, codul genetic permite formarea unei proteine mutante, care este foarte adesea funcțio-

nală și uneori poate fi chiar „mai bună” decât cea sintetizată de organismul de tip sălbatic. Prin acest mecanism se poate realiza chiar o „îmbunătățire” treptată a genomului și a produșilor săi. Datorită acestor particularități, în ansamblu, în cursul evoluției, selecția naturală a acționat pentru a favoriza stabilirea unui cod genetic autocontrolabil, având tendința de a minimaliza efectele nocive ale mutațiilor. Totodată a permis o serie de înlocuiri de aminoacizi, pornind, de la care, tot prin selecție, unele proteine din bacteriile de tip sălbatic au putut fi înlocuite cu forme ce asigură o valoare superioară de supraviețuire.

Codul genetic primitiv

Originea și evoluția informației genetice (fig. 143), ca și natura codului primitiv sînt foarte controversate. După Chapeville și Haenni (1974), acizii nucleici primitivi ar fi fost constituiți numai din două baze, nu din patru ca în prezent. Aceste baze ar fi fost A și I (inozină), între care este posibilă o anumită complementaritate, așa cum demonstrează asocierea lor în anumite interacțiuni codon—anticodon. Un sistem bazat pe A și I ar fi avut avantajul că a permis incorporarea în cod a G și C.

Evoluția spre un cod format din patru baze a fost o necesitate, deoarece codul cu două baze este prea restrictiv pentru a forma structuri dublu helicale și cu o capacitate de codificare redusă. De asemenea, cu numai trei baze este greu de conceput un acid nucleic replicabil. Este probabil că organizarea sub formă de triplete a fost foarte timpurie, deși unii cercetători admit și existența anterioară sau concomitentă a unui cod dublet sau cvadruplet. Este probabil că în cursul evoluției, codul triplet a fost selecționat ca mai avantajos și din considerente structurale. Mole-

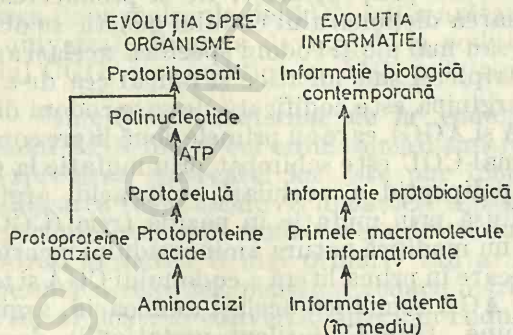
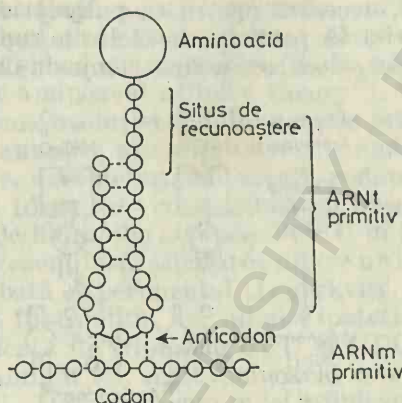


Fig. 143. — Reprezentarea schematică a căilor de evoluție a organismelor vii și a informației (după Fox, 1980).

culele de ARNt au o formă, structură și diametru care au dictat mărimea codonului (fig. 144). Într-un cod dublet recunoașterea codon—anticodon nu ar fi fost posibilă, din cauza imposibilității de juxtapunere, în spațiul respectiv, a două molecule de ARNt adaptor adiacente. După Chapeville și Haenni (1974), ideea unui cod format din una sau două litere este contrară principiului continuității. Tranziția de la un cod cu una la două litere, ca și de la două la trei ar fi perturbat profund semnificația ARNm și sinteza tuturor proteinelor. Dar, este probabil că într-un cod triplet

primitiv, cele trei baze nu au avut o semnificație egală. Este posibil ca inițial o singură bază sau primele două să fi determinat semnificația codonilor. Astfel, Fuller și Hodgson (1967), bazându-se pe faptul că primele

Fig. 144. — Modelul schematic de ARNt primitiv cu un situs discriminator și o tripletă anticodon (după Orgel, 1968).



două litere ale codonului au și în prezent o specificitate mai mare, consideră că inițial cuvintele de cod au fost „dublete” și codificau un număr de 15 aminoacizi „primordiali” și un semnal „stop”. Cel de-al treilea nucleotid avea rol în punctuație („virgulă”). Apariția grupului de aminoacizi „noi” (asparagină, arginină, glutamină, metionină, tirozină și triptofan) a necesitat existența unei triplete codificatoare : al treilea nucleotid al codonului a derivat, probabil, din cel folosit în codul originar dublet ca „virgulă”.

Modificarea tipului de codificare în cursul evoluției. După Black (1973), singura ipoteză rațională asupra originii procesului de codificare genetică este aceea a existenței inițiale a unui proces simplu, pornind de la care a evoluat, printr-o restructurare radicală în natura matriței și a codului însuși, mecanismul actual. Mecanismul direct de codificare, activ în fazele primordiale de evoluție, s-a realizat prin „potrivirea” și legarea

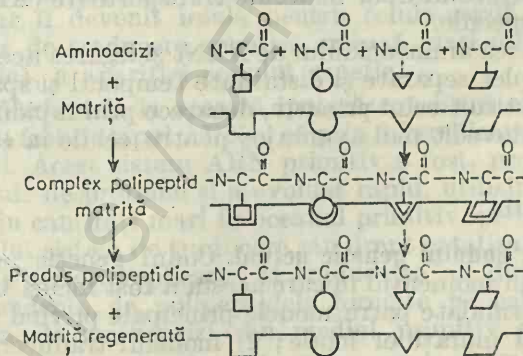


Fig. 145. — Reprezentarea schematică a procesului de codificare directă, prin care moleculele de aminoacizi sînt aliniate pe o suprafață matrită, într-o secvență specifică, pentru a forma un polipeptid.

grupărilor laterale de un situs specific, complementar pe suprafața matrițe. Rezultatul a fost alinierea moleculelor de aminoacizi pe suprafața matriței într-o secvență specifică, urmată de legarea lor pentru a forma un polipeptid (fig. 145).

Procesul a fost dirijat de o forță de atracție între aminoacizi și matrită, presupusă a fi hidrofobă. Complexul polipeptid — matrită rezultat a avut o stabilitate foarte mare. Evoluția a fost condiționată de desfacerea complexului, necesară pentru ca polipeptidul să-și exercite funcția catalitică, iar matrită să participe în ciclurile replicative adiționale. Procesul a fost foarte lent, deoarece a fost stinjenit de forța stabilizatoare, care a făcut

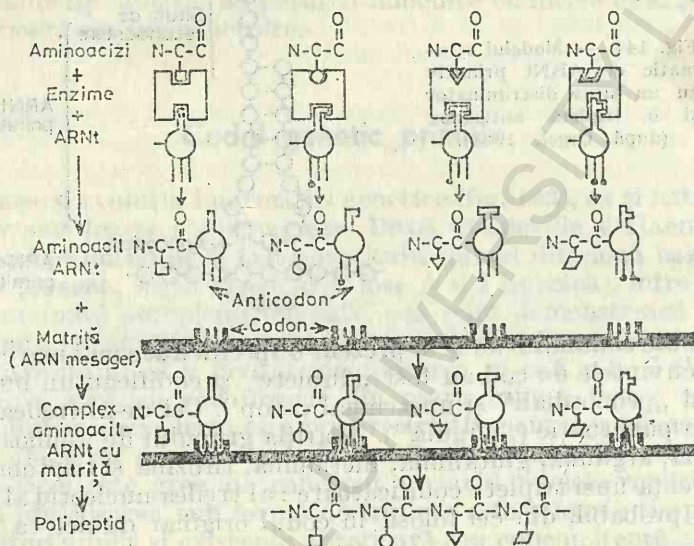


Fig. 146. — Reprezentarea schematică a procesului de codificare indirectă, care acționează în celulele vii.

să apară codificarea directă. Procesul de codificare indirectă, activ în celulele actuale (fig. 146), implică prezența unei matrită, ARNm, care poartă situsuri specifice numite codoni. Aminoacizii nu se pot lega decât indirect de aceștia prin intermediul unor molecule transportoare (ARNt), de care sînt legați în mod specific.

Cele două procese (legarea aminoacidului de ARNt și legarea acestuia de codon) sînt procese complet separate și distanțate temporal și spațial. Mecanismul indirect s-a substituit celui primitiv, deoarece prin rapiditatea de acțiune și acuratețe s-a dovedit mai avantajos pentru celule în cursul evoluției.

Evoluția codului primitiv

Ipoteza asupra originii codului genetic actual. Codul genetic actual derivă din codul primitiv, din momentul în care acesta a fost inclus într-o celulă ancestrală. Au fost formulate patru modele principale privind căile acestei evoluții: 1) modelul mutațiilor letale; 2) modelul traducerii cu erori și ambiguități; 3) modelul extensiei vocabularului și 4) modelul afinității dintre codoni și aminoacizi. Analizînd particularitățile acestor modele ipotetice, Woese (1969) le numește pe primele trei „modele stocastice”, deoarece ele sînt rezultatul unei succesiuni de evenimente aleatorii, supuse legilor hazardului. Acestea au în comun faptul că semnificația codonilor

s-a modificat în cursul procesului evolutiv. Cel de-al patrulea model, bazat pe interacțiunile dintre nucleotide și aminoacizi, îl consideră mai degrabă „determinist” decât stocastic.

Ipoteza afinității stereochemice. După această ipoteză, codificarea unui aminoacid de către anumiți codoni este consecința unei relații stereochemice sau afinități între aminoacid și codonii respectivi. Teoria afinității dintre codoni și aminoacizi („codon-aminoacid affinity theory”), formulată de Woese (1967), rezolvă problema evoluției codului genetic prin simpla presupunere a existenței unei anumite afinități între un aminoacid și anumiți codoni din codul primitiv, care determină natura codonilor ce pot specifica un anumit aminoacid. Ideea este compatibilă cu observația că toți aminoacizii cu lanțuri laterale hidrofobe au codoni cu U în mijloc, U fiind o bază foarte hidrofobă. În prezent însă, afinitatea dintre un aminoacid și codonii săi nu poate fi probată experimental (Lagerkvist, 1980). Întrucât această relație nu a putut fi stabilită, s-a admis ipotetic, spre exemplu, că fenilalanina este codificată de tripletele UUU și UUC și nu de alte triplete, pentru că, într-un anumit fel, acest aminoacid este „înru-dit” stereochemic cu acești codoni. Deși existența unei afinități între aminoacizi și anticodoni nu a fost demonstrată, posibilitatea unei afinități între anumite nucleotide sau oligonucleotide și aminoacizi nu poate fi exclusă, cel puțin în anumite cazuri. Astfel, este greu de imaginat cum s-a format codul genetic în absența totală a unei astfel de afinități. În fața dificultăților de a aduce probe contemporane în favoarea acestei ipoteze, susținătorii ei pledează pentru o înțelegere în raport cu perioada în care a apărut codul genetic, în care codonii și moleculele de ARNt nu au avut obligatoriu structura actuală, iar interacțiunile dintre ele nu au fost — în mod cert — cele implicate în traducerea genetică actuală.

Ipoteza alegerii arbitrare. După această ipoteză, relațiile inițiale dintre oligonucleotide și aminoacizi s-au stabilit în mod pur arbitrar, dar, progresiv, s-a realizat alegerea unor aminoacizi care ofereau avantaje selective. Procesul s-a oprit odată cu încorporarea celui de-al douăzecilea aminoacid, după care codul a devenit „încrămășat”, deoarece orice schimbare ar fi devenit letală pentru celula-gazdă. Complexitatea sistemelor actuale de traducere genetică creează mari dificultăți în stabilirea, chiar ipotetică, a apariției codului genetic.

Variantele la această ipoteză consideră că primele molecule replicative au fost de tipul ARN și că prin diversificare au format strămoșii ARN actuali. Acest sistem ARN primitiv a fost, probabil, la originea primelor molecule de proteine și a evoluat rapid, utilizând anumite polipeptide formate în cantități mari în oceanul primitiv, pe care le-a folosit în formarea primului sistem de traducere sau drept catalizatori pentru propria sa replicare. Ulterior, replicarea și traducerea au devenit complet autonome și independente de polipeptidele formate pe cale abiotică. Pe măsură ce rezerva de aminoacizi din mediul primitiv s-a epuizat, au apărut căile celulare de sinteză a lor. După această ipoteză, asemănările dintre codonii care definesc o familie de aminoacizi ar putea fi datorite evoluției paralele cu codonii a unor elemente ale sistemului de traducere, ca, de exemplu, ARNt- aminoacilsintetazele etc. (Chapeville și Haenni, 1967).

Teoria mutațiilor letale („Lethal mutation theory”). Formulată de Sonneborn (1965), ea și de Goldberg și Wittes (1966), are la bază ideea, că mutațiile sînt evenimente dăunătoare sau cel mult neutre și că orice reducere a numărului lor reprezintă un avantaj selectiv pentru celule. Ca urmare, evoluția codului genetic a avut tendința de a minimaliza efectul mutațiilor, prin apariția de modificări bazate pe două mecanisme: 1) toți sau aproape toți codonii au avut capacitatea de a codifica aminoacizi; 2) codonii înrudiți (interconvertibili prin schimbarea unei singure baze) au codificat același aminoacid sau cel puțin un aminoacid structural și funcțional înrudit, fapt care a diminuat riscul de a produce modificări importante în proprietățile proteinelor modificate.

Structura actuală a codului genetic, în care 61 din cei 64 de codoni sînt codoni-sens, și caracterul său „degenerat” sînt foarte aproape de cele prezise de această teorie. Ea este criticată însă, deoarece are ca punct de plecare existența, puțin probabilă, a celor 20 de aminoacizi și nu face nici o referință la celula originară, lăsînd impresia că a fost similară celor actuale, ceea ce este greu de conceput. Avantajul selectiv conferit de reducerea ratei mutațiilor într-o celulă primitivă cu un aparat genetic cu erori limitate („error ridden”) este foarte mic. Îmbunătățirea traducerii genetice printr-o fidelitate mai mare este mai avantajoasă decît reducerea numărului mutațiilor dăunătoare (Woese, 1967).

Teoria expansiunii vocabularului („Vocabulary expansion theory”). Formulată de Crick (1968), consideră că evoluția codului genetic a trecut printr-o fază cînd capacitatea de traducere genetică a celulei era rudimentară și imprecisă. În această fază, numărul aminoacizilor era mult mai mic decît cel actual și, datorită impreciziei mecanismelor de recunoaștere, fiecare codon corespundea, probabil, unui grup de aminoacizi. Codul era foarte ambiguu. Astfel, codonii pentru alanină puteau codifica și glicocolul, cei pentru treonină codificau și serina ș.a.m.d. Din cauza impreciziei în funcționarea mecanismelor genetice care nu puteau face o traducere unică a unei „gene” și numărului mic de aminoacizi, în această fază s-au format numai proteine construite relativ imprecis („proteine statistice”). Ele au reprezentat — cu toate aceste imperfecțiuni — punctul de plecare pentru apariția celor cîteva funcții urenzimice* rudimentare, nesofisticate, ale celulei primitive (Woese, 1965). În această fază, celulele produceau un număr mic de proteine brute „imature”, deoarece numărul aminoacizilor folosiți era foarte mic.

Evoluția a determinat treptat două modificări semnificative. În primul rînd, a lărgit „vocabularul aminoacizilor” în celula primitivă, adăugînd noi aminoacizi celor preexistenți. Expansiunea vocabularului s-a produs deci cînd un aminoacid nou a folosit un codon liber dintr-o familie de codoni, care defineau un aminoacid preexistent, înrudit structural și funcțional cu cel nou. Acest mecanism explică relațiile actuale dintre codonii care definesc anumite familii de aminoacizi. Conform acestui model, cei cîteva aminoacizi primitivi erau definiți inițial numai de prima bază a codonilor. Expansiunea vocabularului pînă la cei 20 de aminoacizi actuali

* ur — prefix: primitiv, originar, cel mai precoce în timp.

a necesitat inițial utilizarea primelor două baze ale fiecărei triplete și final și a celei de-a treia. Este posibil ca în cursul acestui proces o parte din codonii originari să-și fi schimbat semnificația sau chiar ca evoluția să fi șters orice urmă a codului primitiv. Paralel cu creșterea numărului aminoacizilor s-a realizat o creștere în precizia recunoașterii lor, prin apariția de noi molecule de ARNt și de enzime. Fiecare etapă a fost însoțită de modificări mutaționale, care au determinat înlocuirea codonilor ambigui, în așa fel încât fiecare codon codifica un singur aminoacid. Rezultatul final al modificărilor complexe a fost apropiat de cel al codului actual: aproape în toate cazurile, primele două baze sînt aceleași pentru un aminoacid dat; pentru a treia bază relația este mai puțin riguroasă („wobble”). Ca urmare, aminoacizii similari au tendința de a avea codoni similari (Crick, 1968).

Pe măsură ce procesul evolutiv a progresat, au fost codificate din ce în ce mai multe proteine, activitățile celulare au devenit mai complexe și mai riguros controlate, pînă cînd s-a ajuns la situația că orice aminoacid nou introdus ar fi perturbat funcția celor mai multe proteine. În această fază, codul genetic a „înghețat”, în sensul că în prezent nu ne mai așteptăm la modificări evolutive, în continuare, în structura sa. Crick (1965) a formulat cel dintîi ipoteza conform căreia codul actual ar fi rezultatul unui „îngheț” care l-ar fi făcut imuabil („frozen accident theory”). „Înghețarea” codului genetic — la un moment dat — a fost necesară, deoarece orice schimbare ar fi produs modificări extrem de dezavantajoase în structura proteinelor sau ar fi fost chiar letală.

Teoria codului genetic explică de ce codul genetic devenit universal nu trebuie să se mai schimbe. Ea presupune însă — cel puțin în varianta sa extremă — că atribuirea codonilor la anumiți aminoacizi, pînă la această etapă, a depins integral de hazard. Această ipoteză a fost reluată de Eigen (1971) și, într-o variantă extremă, de Jukes (1978). Ei consideră că particularitățile structurale ale codului, așa cum există ele astăzi, nu ar fi în mod obligatoriu rezultatul unui proces de selecție care a ținut spre o maximă fidelitate și eficiență în stocarea și ameliorarea informației genetice celulare.

După Eigen (1971), organizarea actuală a codului ar putea fi un accident provocat de prezența într-un stadiu precoce al evoluției a moleculelor adaptor primitive, care întîmplător au determinat semnificația codonilor. Cînd s-a ajuns la un anumit nivel de complexitate și eficiență în stocarea și transferul informației în cursul evoluției, codul a devenit permanent pentru că orice modificare mutațională în structura sa ar fi fost, puternic contrată de evoluție.

În ipoteza sa, Jukes (1978) respinge o evoluție a codului în sensul celei mai bune asortări a aminoacizilor și codonilor pentru a favoriza viața, pe baza faptului că acest concept este prea asemănător unei predestinări. El sugerează că organismele vii au evoluat în așa fel, încît au dobîndit avantaje maxime din compoziția codului genetic format întîmplător, în așa fel încît o anumită specie să se adapteze nișei sale ecologice.

Aceste două ipoteze sînt criticate de Hoffman (1974) și Lagerkvist (1980), după care este greu de conceput că distribuția codonilor în codul genetic este un accident și că particularitățile sale structurale ar fi întîmplătoare și lipsite de semnificație.

Teoria erorilor de traducere genetică („Translation-error-ambiguity”) concepută de Woese (1965, 1967) are la bază presupunerea că „mașinăria” de traducere a celulei primitive a fost foarte simplă și imperfectă, comparativ cu cea actuală, și ca atare foarte predispusă la erori. Distincția între anumiți codoni a fost inexistentă sau neînsemnată. Deci, celula primitivă nu putea deosebi un anumit codon de altul și nici aminoacizii individuali, ci numai *un grup* de aminoacizi sau *un grup* de codoni. Ca urmare, celula primitivă nu traducea un mesaj genetic într-o proteină unică cu structură determinată genetic, ci într-un grup de proteine, mai mult sau mai puțin înrudite, mai mult *statistic* similare, decât similare. Nu numai că un anumit codon era „citit” greșit de la o traducere la alta, dar chiar celula nu putea să deosebească clar, și în unele cazuri deloc, diferenții aminoacizi, care erau prin definiție „înrușiți”.

Teoria prevede că evoluția celulelor s-a făcut într-o serie de etape succesive, al căror efect a fost minimalizarea erorilor de traducere, printr-o rearanjare și optimizare a semnificației codonilor, și o recunoaștere a lor mai exactă. La capătul unei serii de etape de optimizare a semnificației codonilor ar fi apărut catalogul actual de codoni, în care erorile de traducere ale aparatului primitiv sînt minimalizate (Woese, 1967; Lagerkvist, 1980). Datorită mecanismelor de traducere imperfecte, modificările în semnificația diferenților codoni nu au produs efecte drastice și noi, așa cum s-ar produce în celulele actuale. Ele au avut ca rezultat producerea unor proteine care nu se deosebeau radical de cele care variau în mod normal, ca rezultat al mecanismului de traducere imperfect. În astfel de împrejurări, codul genetic a avut posibilitatea să evolueze și să ajungă treptat la o stare în care se produceau foarte puține erori de traducere. Unele particularități ale codului actual, ca de exemplu caracterul „degenerat” și „flexibilitatea” („wobble”), arată că evoluția s-a făcut probabil în direcția reducerii erorilor de traducere (Lagerkvist, 1980). Pe această cale s-a obținut sinteza de proteine suficient de „bune”; pentru ca la rîndul lor să îmbunătățească „mașinăria” de traducere genetică și performanțele ei. Odată ce s-a ajuns la această îmbunătățire a traducerii, celula respectivă a căpătat un avantaj selectiv enorm față de competitorii săi.

Pornind de la ideea că nu toți aminoacizii sînt la fel de importanți pentru celulă, Woese (1967) îi împarte în două categorii: 1) *funcționali* (tirozina, histidina, lizina, acidul glutamic și triptofanul), implicați în mod special în activitățile enzimatice ale proteinelor, și 2) *nefuncționali* (fenilalanina, leucina, izoleucina, valina, alanina și treonina). Ipoteza presupune că unii codoni ar fi mai predispuși la erori decât alții și că în cursul evoluției repartizarea semnificației lor s-ar fi făcut selectiv. Codonii capabili de o traducere mai exactă au fost atribuiți aminoacizilor importanți, iar cei predispuși la erori, celor neimportanți. În plus, codonii care sînt confundați frecvent unul cu altul ar fi fost rezervați aminoacizilor înrușiți structural, fapt care, de asemenea, a minimalizat efectele nocive ale greșelilor de traducere.

Jukes (1966) furnizează un argument important în sprijinul acestei concepții: ferredoxinele celor mai multe specii vechi de *Clostridium*, anaerobe, conțin numai 13 aminoacizi, sub forma unor proteine mici (55 de aminoacizi fiecare), alcătuite din două subunități omologe, codificate de o secvență rezultată din duplicarea unei gene mici, corespunzînd la

numai 28 de aminoacizi. Ferredoxinele speciilor superioare conțin mai multe tipuri de aminoacizi, ceea ce sugerează că apariția aminoacizilor „noi” a avut loc mai târziu în cursul evoluției biologice.

Un punct de vedere aparte este exprimat de Conrad (1970), după care, codul genetic actual ar fi în întregime arbitrar. Punctul de plecare ar fi fost reprezentat de existența a numeroase coduri diferite arbitrare, dintre care numai unul a conferit moleculelor de ADN care îl foloseau avantaje selective, permițându-le să se replice mai eficace. Deci, codul genetic actual ar fi unicul „supraviețuitor” al codurilor existente inițial, care și-a eliminat concurenții.

Deși această ipoteză este susținută și de alți autori, cei mai mulți aderă la concepția exprimată sintetic de Davis, Dulbecco și colab. (1980) care, plecând de la faptul că structura și funcțiile codului genetic actual pot fi ușor corelate cu necesitățile evoluției, afirmă: „este probabil că foarte puțin din cod este datorat întâmplării. Dacă viața terestră ar trebui să înceapă din nou, ea ar putea sfîrși prin a forma aproape același cod genetic”.

Biosinteza proteinelor

(Pl. 20—22)

„Acțiunea genei, executarea prescripțiilor pentru sinteza proteinelor, necesită o transformare univocă a unui sistem de simboluri în altul”

F. JACOB

Structura proteinelor, agenți universali ai activității biologice, morfogenetice, biochimice, fiziologice și ai performanțelor teleonomice, este legată de aceea a acizilor nucleici, agenți universali ai conservării, exprimării și transmiterii potențialului ereditar al organismelor. De aceea, biosinteza proteinelor implică transmiterea informației genetice de la molecula de acid nucleic, unde este codificată, la „dispozitivul” celular producător de proteine — ribosomii — în așa fel încât secvența nucleotidelor să se traducă printr-o anumită secvență a aminoacizilor în lanțul polipeptidic care constituie structura de bază a proteinei. Asamblarea aminoacizilor într-o ordine specifică, determinată, constituie una dintre principalele funcții ale materialului genetic. S-a calculat că, legind în mod diferit cei 20 de aminoacizi naturali în lanțuri polipeptidice de câte 1 000 de unități, s-ar obține 10^{1278} de proteine dotate cu proprietăți biologice diferite. După Chapeville și Haenni (1974), dacă s-ar sintetiza într-un singur exemplar toate variantele posibile ale unor proteine formate din 400 de aminoacizi (20^{400}) s-ar obține o masă proteică care ar depăși greutatea globului terestru. În afară de rolul lor structural, acela de a alcătui principală componentă a materiei vii, marea majoritate a proteinelor acționează ca enzime sau catalizatori biologici care dirijează numeroasele reacții chimice desfășurate simultan în celulă.

Procesul de biosinteză a proteinelor al cărei mecanism a fost „decifrat” prin cercetările pe sisteme acelulare de *E. coli* se desfășoară în două etape :

1) *Transcrierea* la ARNm a informației genetice codificate în ADN, etapă în care informația este transpusă într-un limbaj nou (A, U, C, G), deosebit de cel al ADN (A, T, C, G), datorită înlocuirii timinei cu uracilul în molecula de ARN. Se formează un tip de ARN denumit de Spiegelman (1958) ARN traducibil („translatable ARN”) sau ARN mesager („messenger ARN”) sau, mai corect, ARN „de mesaj” (deoarece nu mesagerul este tradus, ci mesajul), notat prescurtat ARNm.

2) *Traducerea* informației genetice purtată de ARNm la nivelul ribosomilor. În această etapă, informația transcrisă în limbajul de 4 litere al ARNm este „tradusă” sau convertită în limbajul de 20 de litere, corespunzător aminoacizilor naturali, care intră în structura proteinelor. Ca „dicționar” pentru această traducere funcționează o colecție de molecule de ARNt (ARN „de transfer”), capabile să recunoască atât un anumit aminoacid, cât și codonul corespunzător din molecula de ARNm. Datorită

unor particularități structurale specifice, ARNt poate să dispună aminoacizii în poziții specifice de-a lungul moleculei de ARNm, asigurând „citirea” și „traducerea” mesajului genetic în secvențe polipeptidice.

Transcrierea informației genetice

Transcrierea informației genetice este un proces complex de sinteză a ARN (ARNm, ARNt, ARNr), după o matriță de ADN, mediat de enzima ARN polimeraza (transcriptaza), cu cooperarea unor factori speciali, activi în diferitele etape ale transcrierii. Ea are loc numai în regiuni delimitate ale ADN, mărginite de situsuri specifice de recunoaștere, inițiere și terminarea sintezei. În celulele de *E. coli*, transcrierea începe simultan la ~ 500 localizări separate. Dintre acestea, ~ 200 de situsuri corespund moleculelor de ARNr și ARNt, care sînt transcrise de la $\sim 0,7\%$ din genom ($\sim 1,6 \times 10^5$ nucleotide). Restul de ~ 300 de situsuri reprezintă situsuri de sinteză a ARNm, corespunzînd la mai puțin de 10% din genom (nu mai mult de 2×10^6 nucleotide). Restul de informație (deși mai mult de 90% din genom este format din gene structurale) este practic în orice moment „tăcută” sau latentă și nu este transcrisă.

Biosinteza ARN se poate efectua prin trei mecanisme enzimatice diferite: 1) în absența unei molecule cu rol de model sau matriță, cu ajutorul enzimei polinucleotid fosforilaza; 2) prin copierea unei molecule de ADN de către ARN polimerază sau 3) prin copierea unei molecule de ARN, în cazul replicazei virale.

Polinucleotidfosforilaza, descoperită de Grunberg-Manago și Ochoa (1955), universal răspîndită la bacterii, a fost evidențiată de asemenea în mitocondriile levurilor și în cloroplastele unor plante. Are două funcții:

1) Catalizează polimerizarea nucleotid difosfaților, după reacția: $NDP + (NMP)_n \rightleftharpoons (NMP)_{n+1} + Pi$. Nu poate copia un polinucleotid dat și deci nu are nevoie de matriță. În consecință, nu poate forma un polimer cu o secvență specifică de baze. Asigură sinteza de homopolimeri (cînd în mediu este o singură bază) sau de copolimeri, în prezența unor baze diferite. În acest caz, proporția bazelor în mediu determină proporția lor în copolimer, în care însă distribuția este aleatorie.

2) Funcția de fosforoliză a polinucleotidelor sintetice, în general. Este probabil că polinucleotid fosforilaza nu este activă în celula bacteriană. După Segiguchi și Cohen (1963) ar putea fi implicată în *circo* în degradarea ARNm și anume a fragmentelor rezultate din acțiunea inițială a unor endonucleaze.

Transcrierea genetică este un proces care implică interacțiunea complexă între ARN polimerază, matrița de ADN, substratul (XTP) și produsul transcrierii, ARNm. El evoluează în 5 etape; 1) recunoașterea (alegerea) matriței și formarea complexului de preinițiere; 2) inițierea polimerizării; 3) creșterea catenei de ARNm; 4) terminarea sintezei și 5) eliberarea ARN produs (Huang, 1971).

Recunoașterea matricei și formarea complexului de preinițiere. Transcrierea asimetrică

În celule, transcrierea ADN dublu catenar este asimetrică, în sensul că, raportat la un anumit cistron sau operon, este transcrisă numai una din catene (cealaltă catenă antiparalelă, nefiind transcrisă pentru regiunea respectivă). Dacă ar fi copiate ambele catene, fiecare genă ar produce câte două tipuri de ARNm cu secvențe complementare, ceea ce ar duce la sinteza a două proteine diferite. Catenă folosită în transcriere este numită *catenă informațională* (*catenă sens* sau *codogenă*) (fig. 147). Existența tran-

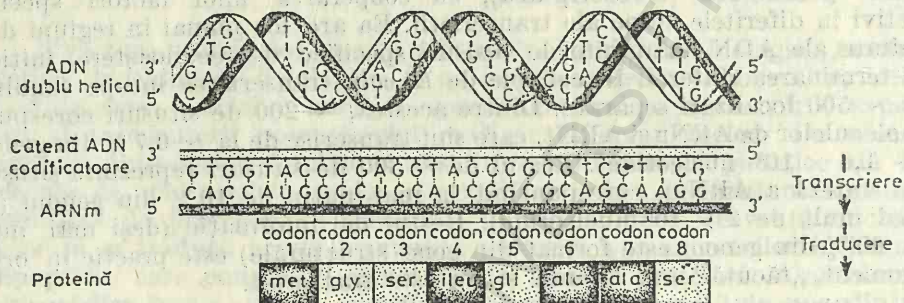


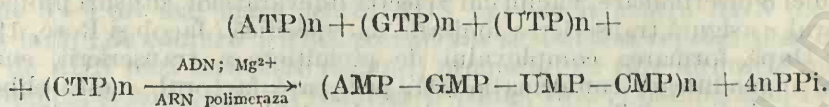
Fig. 147. — Reprezentarea schematică a relațiilor ADN → ARN → polipeptide evidențiind: 1) polaritatea opusă a celor două catene ale ADN; 2) transcrierea ARNm în direcția 5' → 3' complementară catenei sens a ADN, care are polaritatea 3' → 5'; 3) secvența bazelor în ARNm și polaritatea sa sint cele ale catenei antisens a ADN, exceptînd faptul că în ARN, timina este înlocuită de uracil.

scrierii asimetrice a fost demonstrată cu ajutorul formei „replicative” d.c. a fagului Φ X174. În acest caz, la *E. coli* infectată, numai una din catene este transcrisă la ARNm și acesta nu hibridează cu genomul viral. Atît genomul viral (ADN monocatenar), cît și ARNm sînt de tip $\ll + \gg$, ceea ce demonstrează că ARNm s-a format prin transcrierea catenei $\ll - \gg$ a ADN replicativ. Catenă „sens” poate fi identificată prin capacitatea sa de a forma hibridi moleculari specifici ADN-ARN cu ARNm corespunzător. *In vivo*, ea este selecționată de factorul sigma (σ), care restrînge activitatea ARN polimerazei la această catenă ce conține situsul specific de inițiere a transcrierii. Mecanismul intim al selecției este necunoscut.

În unele cazuri (fagul T Δ , λ etc.), transcrierea este complicată prin faptul că în anumite regiuni informația „sens” este localizată pe catene diferite. În consecință, una din catene („catena Watson”) servește drept matrice pentru o parte din gene (de obicei grupuri de gene vecine), în timp ce restul genelor sînt transcrise de pe cealaltă catenă („catena Crick”). De asemenea, în cazul anumitor operoni la *E. coli* transcrierea se realizează parțial în sens orar și parțial în sens antiorar pe cromosomul circular (*transcriere divergentă*) (fig. 307 A).

ARN polimeraza dependentă (dirijată) de ADN („DNA-dependent (directed) RNA polymerase”) sau *transcriptaza* este un complex multi-enzimatic, cu structură cuaternară complexă. Cea mai cunoscută este ARN polimeraza de la *E. coli*, identificată de Geiduschek și Haselkorn (1969)

și a cărei structură a fost descrisă de Burgess (1969). Ea leagă ribonucleotidele catalizînd formarea de legături fosfodiester internucleotidice succesive, în prezența ADN ca matriță, asigurînd alinierea în ordine corectă a precursorilor, după reacția globală :



Pentru a realiza această sinteză corect, ARN polimeraza are trei funcții esențiale adiționale : 1) selecționează catena purtătoare de informație ; 2) recunoaște începutul și sfîrșitul genelor ; 3) răspunde la acțiunea unor factori de reglare pozitivă sau negativă.

Structură chimică. ARN polimeraza din *E. coli* este o enzimă alosterică cu structură de heteromultimer, dintre cele mai complexe descrise la bacterii (g.m. ~ 496 000 dal).

Enzima globală (holoenzima) este alcătuită din 4 subunități majore α , β , β' , σ , în raportul unitar 2 : 1 : 1 : 1. Prin disocierea factorului sigma (σ), ea poate exista și sub o formă alternativă cu formula de structură $\alpha_2\beta\beta'$, corespunzînd *enzimei minimele* (engl. „core”) sau *apoenzimei* (deși termenul este puțin impropriu în acest caz (Gros și Grundberg-Manago, 1974). La *E. coli*, ~ 30 % din enzimă este prezentă ca holoenzimă ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) și restul ca enzimă minimală. Este probabil că această proporție scăzută a holoenzimei nu reflectă exact situația din celula vie, deoarece factorul se poate disocia în cursul izolării și purificării enzimei (Doi, 1977). După disociere, asamblarea subunităților se face în ordinea : $2\alpha \xrightarrow{\beta} \alpha_2\beta \xrightarrow{\beta'} \alpha_2\beta\beta' \xrightarrow{\sigma} \alpha_2\beta\beta'\sigma$, care reflectă relațiile lor în structura enzimei (fig. 148).

Fig. 148. — Reprezentarea schematică a ARN polimerazei și a subunităților sale de construcție.



Funcțiile subunităților componente. Subunitățile α , g.m. 41 000 dal, sînt esențiale pentru reconstituirea enzimei active prin reasocierea celorlalte subunități și probabil pentru recunoașterea secvenței promotor. Subunitățile β (~ 155 000 dal) și β' (~ 165 000 dal) sînt cele mai mari polipeptide prezente în celulele procariote (Matzura și colab., 1973). Subunitatea β este implicată în fazele catalitice inițiale, iar β' participă în legarea de ADN (Doi, 1977 ; Jacob și Rose, 1980).

Rolul factorului sigma. Factorul sigma este o proteină (~ 95 000 dal) inertă, în stare liberă, dar cu rol esențial în recunoașterea situsurilor de

inițiere a transcrierii genetice de-a lungul moleculei de ADN și în asamblarea corectă a ARN polimerazei. În absența sa, enzima minimală realizează transcrierea cu o viteză foarte redusă și nespecifică, putând transcrie la întâmplare ambele catene ale ADN, datorită inițierii sintezei de ARN fără nici o discriminare. Facilitând selecția adevăratelor situsuri promotor, factorul σ asigură transcrierea limitată, dar specifică (Jacob și Rose, 1980).

După formarea complexului de preinițiere a transcrierii, enzima suferă o modificare conformațională, prin care factorul σ este eliberat, redevenind disponibil pentru a se lega de altă enzimă minimală (ciclul σ , fig. 149). (Girard și colab., 1972). Această comportare explică de ce σ se găsește în celule în cantități mai mici decît enzima minimală (Travers și Burgess, 1969).

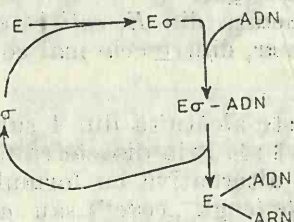


Fig. 149. — Ciclul factorului sigma în cursul transcrierii genetice.

Pe lângă subunitățile majore au fost descrise și alte subunități asociate, ca de exemplu: 1) factorul ω ($\sim 9\,000 - 12\,000$ dal) asociat cu holoenzima *E. coli*, dar cu rol încă neelucidat; 2) factorul σ ($\sim 56\,000$ dal), care face parte din holoenzima II, a cărei funcție specifică este necunoscută ca și relația cu factorul σ ; 3) factorul τ ($\sim 110\,000$ dal). Nu se știe încă dacă factorii ω și τ sînt constituenți specifici, contaminanți sau factori de reglare (Jacob și Rose, 1980).

E. coli conține $\sim 1\,300 - 4\,000$ molecule de ARN polimerază/celulă. Datorită dimensiunilor sale mari, transcriptaza se leagă de ~ 750 pb, respectiv pe o distanță de ~ 250 nm din lungimea moleculei de ADN (Sagar—Seth, 1971). Spre deosebire de procariote, în celulele eucariote

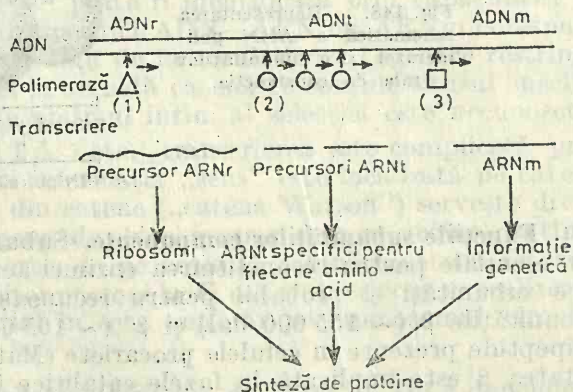


Fig. 150. — Transcrierea genetică la eucariote este efectuată de trei ARN polimeraze (1, 2, 3), corespunzătoare celor trei tipuri de ARN (ARNr, ARNT și ARNm), diferite ca mărime, structură, formă și funcție.

fiecare clasă de ADN (ARNr, ARNT, ARNm) este sintetizată de o ARN polimerază specifică, produșii respectivi fiind diferiți ca mărime, compoziție chimică, formă și funcție (fig. 250).

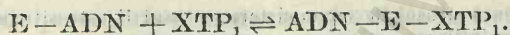
Legarea și preinițierea

Experimental s-a demonstrat că ARN polimeraza din *E. coli* are o mare afinitate pentru ADN, indiferent de originea sa biologică. Afinitatea este de 5–6 ori mai mare pentru ADN m.c. decât pentru ADN d.c. În prima fază, „de căutare”, ARN polimeraza se asociază repetat și se disociază de ADN până întâlnește regiunea promotor, cu care formează inițial un complex, specific, dar lax (Saucier și Wang, 1972; Chamberlain, 1974).

Preinițierea este un proces imprecis din punct de vedere fizicochimic, care pregătește complexul ADN–ARN polimerază pentru a reacționa cu primul nucleotid ce va fi încorporat în ARN. Este probabil că sub influența factorului σ , enzima minimală legată de ADN ar suferi o tranziție aloterică, prin care s-ar forma un complex stabil la nivelul situsului promotor.

Inițierea

Această etapă nu corespunde unei etape temporale definite, separată de cea anterioară și are loc la nivelul unei secvențe specifice după reacția :



Natura situsurilor de recunoaștere și inițiere. Dickson și colab. (1975), utilizând tehnicile moderne de secvențializare a ADN și ARN, au evidențiat prezența unui număr de secvențe de baze cu anumite paterne de organizare, situate în regiuni critice pentru reglarea diferitelor faze ale transcrierii genetice. După Doi (1977), ARN polimeraza *E. coli* recunoaște, pentru inițierea transcrierii, trei situsuri diferite :

1) *Situsul R* („Recognition”), care este recunoscut inițial, considerat drept cel mai important pentru selectivitatea procesului. Este, în general, bogat în A–T și localizat la o distanță de $\sim 25-35$ nucleotide, pe partea 5' a promotorului. Secvențializarea a 4 situsuri R la *E. coli* a evidențiat existența unor diferențe semnificative în secvența bazelor. Aceasta demonstrează că holoenzima *E. coli* poate recunoaște secvențe similare, dar nu identice.

2) După recunoașterea situsului R, enzima se deplasează în direcția 3' până la *situsul B* de legare strânsă („Tight Binding Site”) situat în centrul regiunii promotor, lung de 7 pb. Acest situs, descris inițial de Pribnow (1975) la fagul T7, este cunoscut sub denumirea de secvență („cutia”) lui Pribnow („Pribnow box”, „encart de Pribnow”). El are o structură aproape neschimbată în toți promotorii de la procariote studiați până în prezent (tabelele nr. 24, 25).

La eucariote, acest situs este organizat pe același principiu, dar cu secvențe puțin modificate (PyATAPu), și este situat la câteva zeci de nucleotide în amonte față de „situsul” de inițiere. Este cunoscut sub denumirea secvența sau „cutia” lui Hogness („Hogness box”). Diferențele individuale în secvența acestor situsuri de la un promotor la altul reflectă diferențe în eficiența promotorului care permite unor operoni să fie transcriși mai ușor sau mai greu. Mutațiile punctiforme la nivelul situsului B

atrag inactivitatea promotorului respectiv, fapt care explică rolul său crucial în transcriere. Enzima se leagă de ADN și îl protejează de activi-

Tabelul nr. 24

Structura situsurilor de recunoaștere, legare și inițiere ale ARN polimerazei *E. coli*

ADN	Situsul R	Situsul B	Situsul I
Lac tip sălbatic	AGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTT- CCGGCTCG	<u>TATGTTG</u>	TGTGGA*
Lambda Pr	TAACACCGTGCGTGTTGACTATTTTACC- TCTGGCGGT	GATAATG	GTTGCA
Lambda PL	TATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCAC TGGCGGT	GATACGT	AGCACA
Lambda Prm	CAACACGCACGGTGTTAGATATTTATCCCT- TGCGGT	GATAGAT	TTAACHTA
SV 40	GAATGCAATTGTTGTTGTTAACTGTTTAT TGGAGCT	<u>TATAATG</u>	GTTACA

Situsul R reprezintă situsul de recunoaștere; situsul B este situsul de legare strinsă; situsul I este situsul de inițiere.

* Literele aldine din această rubrică reprezintă extremitatea 5' a ARNm transcris.

Tabelul nr. 25

Situsurile de legare ale ARN polimerazei *E. coli*

ADN	Situsul B		Situsul I
T7 A1	GAAGTAACATGCAG	<u>TAAGATA</u>	CAAATCGCTAGGTAACACTAG- * CAGT*
T7 A3	GAAGTAAACACGG	<u>TACGATG</u>	TACCACATGAAACGACAGTGAG- TCA
fd G2	GCTTTGCTTCTGAC	<u>TATAATA</u>	GACAGGGTAAAGACCTGATT- TTTGA
fd G3	TGTTTCGCGCTTGG	<u>TATAATC</u>	GCTGGGGTCAAAGATGAGTGTT
Lamba PR	TTACCTCTGGCGGT	<u>GATAATG</u>	GTTGCATGTACTAAGGAGGTTG
Lamba PL	ATACCACTGGCGGT	<u>GATACTG</u>	AGCACATCAGCAGGACGCCACT- GAC
Lamba tip sălbatic	ATGCTTCCGGTCTG	<u>TATGTTG</u>	TGTGGAATTGTGAGCGGATAA- CAA
Lac UV-5	ATGCTTCCGGCTCG	<u>TATAATG</u>	TGTGGAATTGTGAGCGATAA- CAA
ARNt ^{Trp}	GGCGCGTCATTTGA	<u>TATGATG</u>	CGCCCCGCTTCCCGAT
Trp	ATCATCGAACTAGT	<u>TAAC TAG</u>	TACGCAAGTTCACGTAAAAGGGT
SV40	TGTTTATTGCAGCT	<u>TATAAT</u>	GTTACAAATAAAGCAATAGCA

Situsul B este situsul de legare fermă; situsul I este situsul de inițiere, * Literele aldine din această rubrică reprezintă extremitatea 5' a ARNm.

tatea DNazei pe o lungime de ~ 30 pb. Deci enzima poate fi simultan în contact atât cu situsul B, cât și cu situsul I.

3) *Situsul I*. Complexul inițial, specific, polimerază — promotor este numit „închis”, deoarece bazele de ADN sînt încă legate perechi. „Intrarea” ARN polimerazei determină „deschiderea” a ~ 11 pb (Siebenlist, 1979) prin desfacerea legăturilor de H dintre cele două catene (fig. 151).

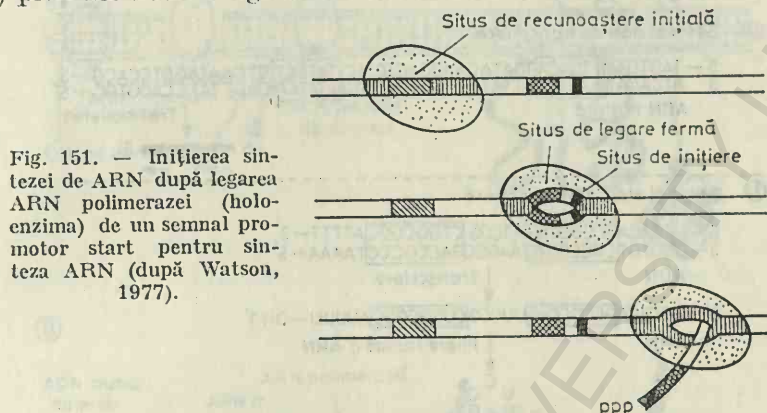
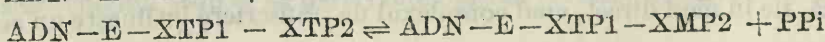
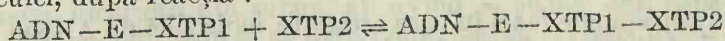


Fig. 151. — Inițierea sintezei de ARN după legarea ARN polimerazei (holoenzima) de un semnal promotor start pentru sinteza ARN (după Watson, 1977).

Astfel, bazele de pe catena sens devin accesibile pentru transcriere, respectiv pentru a forma perechi cu ribonucleotid trifosfații care „vin” în apropierea lor, inițiind transcrierea. După Hillel și Wu (1978), numai subunitățile σ și β vin în contact direct cu ADN la nivelul situsului de inițiere. În cazul în care situsul de „intrare” este separat de cel de inițiere are loc o „migrare” („drift”) a ARN polimerazei (Dickson, 1975 ; Travers, 1976). Primul nucleotid fixat de complexul de preinițiere este un ribonucleozid trifosfat purinic (ATP sau GTP) (Brenner și Stent, 1965). În acest proces regiunea promotor este mult mai mult decît un situs de legare pentru ARN polimerază. Ea conține informație pentru legarea în unele cazuri a factorilor de reglare accesorii, de tipul complexului AMPc — CAP (De Crombrughe și colab., 1971), care acționează prin destabilizarea ADN în regiunea promotor, facilitînd legarea ARN polimerazei (Dickson, 1975). Regiunea promotor se poate suprapune parțial pe situsurile de legare represor sau operator, influențînd funcționarea acestora (Maniatis și Ptashne, 1975). Watson și colab. (1983) consideră că ARN polimeraza ar recunoaște două grupuri de secvențe situate la ~ 35 și respectiv la ~ 10 baze înainte de semnalul „start” pentru transcriere. Modelul propus (fig. 152) explică atît mecanismul de inițiere, cît și pe cel de stopare a procesului, care s-ar produce după transcrierea unui șir de resturi de uracil (U), care urmează unui palindrom. ARN nou transcris ar forma o structură „trunchi și buclă” („stem and loop”) care probabil ar reprezenta semnalul „stop” pentru ARN polimerază.

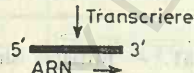
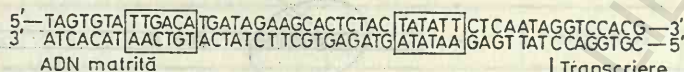
Creșterea moleculei de ARNm

După ce au fost legate primele două nucleotide, ARN polimeraza „aluneacă” de-a lungul matriței de ADN, asigurînd creșterea catenei de ARNm, prin adăugarea secvențială de nucleotide la capătul 3'—OH al moleculei, după reacția :

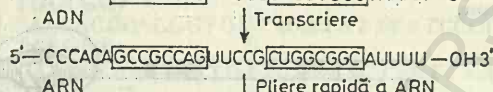
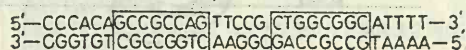


După Krakow și colab. (1976), creșterea ARNm are cel puțin 5 faze; 1) legarea nucleozid-trifosfatului; 2) formarea legăturii fosfodiester; 3) eliberarea pirofosfatului produs; 4) translocția nucleotidului încorporat

Ⓐ Semnal start de transcriere



Ⓑ Semnal stop de transcriere



Pliere rapidă a ARN



ARN pliat determină
terminarea transcrierii

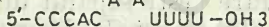


Fig. 152. — Mecanismul inițierii și stopării transcrierii genetice (după Watson și colab., 1983)
a. ARN polimeraza recunoaște două grupuri de secvențe, situate la -35 și respectiv -10 baze de semnalul-start pentru transcriere. b. Ea își stopează activitatea după ce a transcris un șir de resturi de uracil (U), care urmează unui palindrom. ARNm nou transcris formează o structură „trunchi și buclă” care reprezintă, probabil, un semnal-stop pentru ARN polimerază.

la situsul terminus al produsului și 5) translocția enzimei la nivelul nucleotidului următor pe matrită. Transcrierea se face orientat în direcția 5' → 3', antiparalelă față de catena 3' → 5' a ADN (fig. 153).

În cursul creșterii, ARN polimeraza, ADN și ARNm în formare realizează un complex ternar mai greu dissociabil, care poate fi izolat prin tehnici speciale. După ce au fost adăugate ~ 10 ribonucleotide, factorul σ se disociază din holoenzimă pentru a efectua ciclul σ , în timp ce enzima minimală continuă transcrierea. În timpul transcrierii, ADN d.c. suferă o „deschidere” locală cu forma unor vezicule („transcription bubble”). ARNm nou sintetizat formează cu catena sens a ADN un duplex hibrid ARN—ADN tranzitoriu (*intermediarul de transcriere*). Pe măsură ce transcrierea progresează, ARNm are tendința să se separe de matrită care își reface structura dublu helicală.

Terminarea sintezei ARNm

Aceasta corespunde fazei în care creșterea moleculei de ARNm înce-tează, fie în mod direct, când complexul de transcriere întâlnește un semnal

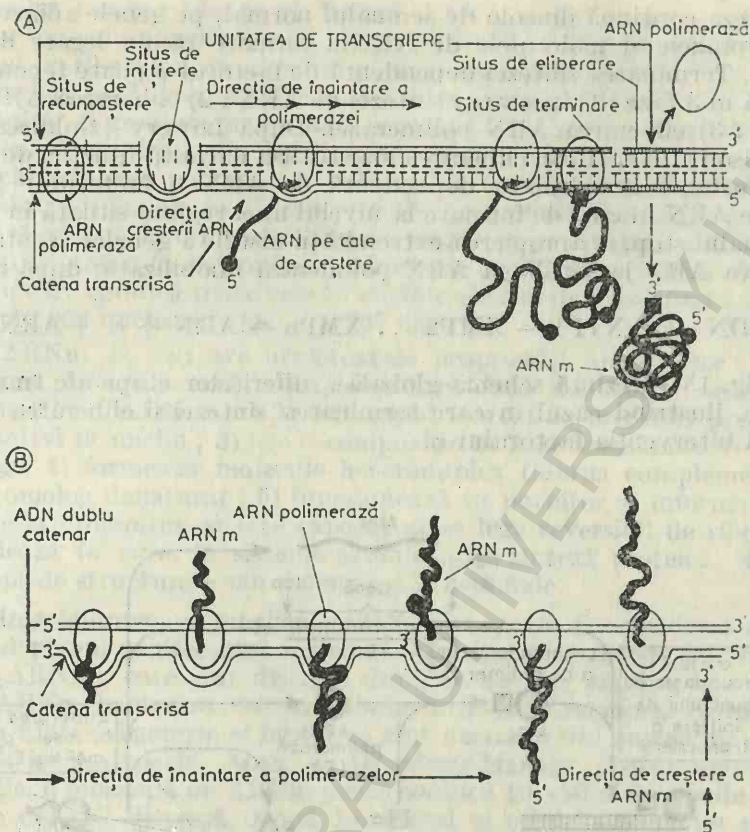
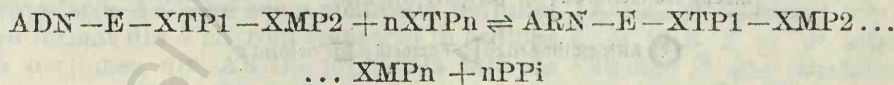


Fig. 153. — Transcrierea genetică. A. ARN polimeraza se fixează la nivelul unui situs de recunoaștere și începe sinteza ARN la nivelul situsului de inițiere, situat în aval, continuând-o până la situsul „stop”. B. Mai multe polimeraze transcriu simultan aceeași unitate de transcriere, în așa fel încât lungimea moleculelor de ARN indică sensul de înaintare a ARN polimerazelor (după Berkaloff, 1981).

de terminare („stop”), fie cel mai adesea prin intervenția unei proteine specifice, factorul ρ . Reacția este următoarea :



Eliberarea ARN sintetizat se face după reacția :



Rolul factorului rho în terminarea sintezei și eliberarea ARNm

Factorul rho (engl. release = eliberare) este o proteină tetra- sau hexameră, alcătuită din subunități avînd $\sim 50\,000$ dal, capabilă „să recunoască” codonii stop și să determine oprirea sintezei de ARN. În lipsa

lui, sinteza continuă dincolo de semnalul normal, pe genele adiacente, iar transcriptazele și moleculele de ARNm formate rămân legate de ADN matriță. Terminarea sintezei dependentă de factorul ρ poate fi conceptual divizată în 3 faze : 1) încetarea sintezei de ARN ; 2) eliberarea ARN de pe matriță ; 3) eliberarea ARN polimerazei. După Lowery — Goldhammer și Richardson (1974, 1978), eliberarea s-ar realiza datorită funcției de nucleozid trifosfat fosfohidrolază dependentă de ARN a factorului ρ . El se leagă de ARN în curs de formare la nivelul unei regiuni situată în amonte de semnalul stop, în apropierea extremității distale a genelor și catalizează eliberarea ARN la sau lângă ARN polimeraza imobilizată, după reacția :



Fig. 154 prezintă schema globală a diferitelor etape ale transcrierii genetice, ilustrând cazul în care terminarea sintezei și eliberarea ARNm necesită intervenția factorului ρ .

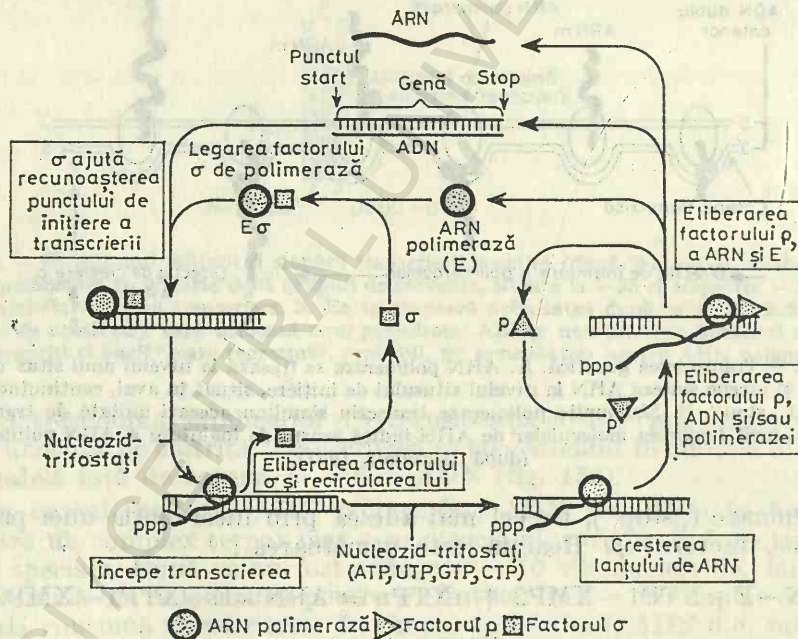


Fig. 154. — Biochimia sintezei de ARN. Schema prezintă un caz în care terminarea catenei necesită factorul ρ . În alte cazuri, ARN polimeraza însăși poate „citi” semnalul terminus (după Watson, 1977).

Particularitățile ARNm la bacterii

Produsul transcrierii genetice, ARNm, este o formă metabolic activă de ARN, cu secvență complementară față de catena sens a ADN, sintetizat sub acțiunea ARN polimerazei dependentă de ADN. Considerat ipotetic

ca absolut necesar (Jacob și Monod, 1961), existența sa a fost probată ulterior pe cale experimentală. El poartă informația genetică de la cromosomi la ribosomi, cu care este intim asociat în procesul de sinteză a proteinelor. La *E. coli*, ARNm formează o populație de molecule eterogene ca lungime și greutate moleculară, corespunzând mesagerilor policistronici (poligenici) rezultați din transcrierea mai multor gene contigue* care codifică formarea mai multor polipeptide cu funcții metabolice înrudite. În medie, ARNm are la *E. coli* $\sim 1\,500$ nucleotide, dar în anumite cazuri poate să ajungă la dimensiuni foarte mari: spre exemplu, ARNm al operonului triptofan (5 cistroni) are o lungime de 7 320 nucleotide, în timp ce ARNm care codifică toate cele 10 enzime ale căii de biosinteză a histidinei are $\sim 12\,000$ nucleotide ($\sim 4 \times 10^6$ dal).

ARNm *E. coli* are următoarele proprietăți importante: 1) are o structură monocatenară, complementară față de catena sens („informațională”) a ADN d.c.; 2) este rapid marcat în prezența precursorilor radioactivi în mediu; 3) are o compoziție în baze asemănătoare cu ADN omolog; 4) formează molecule heteroduplex (hibridi complementari) cu ADN omolog denaturat; 5) funcționează ca purtător al informației genetice de la cromosom și este capabil să se lege reversibil de ribosomi; 6) stimulează *in vitro*, în sisteme acelulare de sinteză proteică, sinteza de polipeptide structurale sau de enzime funcționale.

Instabilitatea metabolică. ADN, care poate fi considerat ca reprezentând planul arhitectural major al celei, este transcris într-o serie de copii (ARNm), care sint distruse după ce au fost folosite de câteva ori. Deci ARNm bacterian este metabolic instabil. Cunoscând cantitatea de ARNm dintr-o bacterie și faptul că sint necesare trei nucleotide pentru a codifica un aminoacid, Gros și Grunberg-Manago (1974) apreciază că, în medie, o moleculă de ARNm poate codifica 10–20 molecule de proteine înainte de a fi distrusă. După Levinthal și colab. (1963), un nucleotid poate alterna de 5–10 ori între rezerva celulară liberă și ARNm înainte de a fi incorporat prin legături covalente într-un ARN metabolic stabil. Ei apreciază că durata medie de viață a unei molecule de ARNm este de $\sim 2\text{--}3$ minute. După Watson (1977), durata medie de viață a ARNm ar fi variabilă și probabil determinată genetic. În celulele de mamifere această durată este de $\sim 8\text{--}12$ ore, corespunzând deci unei capacități de reinnoire de 1 000–câteva zeci de mii de ori mai lentă decât la bacterii.

Degradarea ARNm. Yanofsky și colab. (1969) au demonstrat că degradarea ARN nu are o polaritate definită. Lucrând cu operonul triptofan format din 5 cistroni transcriși în ordinea E, D, C, B, A ei au arătat că porțiunea din ARNm proximală față de cistronul E este degradată înainte ca ARN polimeraza să atingă extremitatea distală A. Deci, degradarea evoluează în direcția $5' \rightarrow 3'$, respectiv cu aceeași polaritate ca și transcrierea informației genetice. Ea implică inactivarea funcțională (pier-

* Sub denumirea de *transcripton*, Hayashi (1964) și Szybalski (1970) au descris unitatea generală de transcriere genetică (= scripton), principală definită prin prezența unui singur promotor autonom. Este reprezentat de un grup de gene și poate conține o varietate de elemente de control pozitive și negative. Operonul bacteriilor este mai degrabă un tip special, decât un singur tip de transcripton (Rieger și colab., 1976).

dereă capacității de a servi ca matriță) și degradarea chimică sub acțiunea $5' \rightarrow 3'$ exonucleazei la nucleozidmonofosfați, care după fosforilare pot fi reutilizați. ARNm bacterian pare să fie sigur stabil numai atît timp cît este legat de ribosomi. După ce capătul $5'$ s-a desprins de ribosomi, un factor încă necunoscut determină evoluția sa ulterioară: degradare enzimatică sau o nouă legare de ribosomi.

Importanța instabilității metabolice a ARNm. Durata mică a vieții ARNm bacterian favorizează adaptarea foarte promptă la un mediu înconjurător schimbător a unor organisme cu o durată de generație scurtă. Ea permite activarea și represia unui număr mare de gene într-un timp limitat. Dacă ARNm ar avea o viață mai lungă, reglarea ar fi prea lentă. Instabilitatea metabolică a ARNm bacterian explică proporția sa de 30–50 de ori mai mică (ponderal) decît cea a ARNr, deși numărul cistronilor transcriși la ARNm este de $\sim 1\,000$ de ori mai mare decît al celor „ribosomali” (Gros și Grunberg-Manago, 1974). ARNm reprezintă după Davidson (1971) 1–2% din ARN total, iar după Huang (1971), 3–5%, (ARNr reprezintă ~ 75 –85%, iar ARNt ~ 10 –20%).

Și la eucariote, cantitatea de ARNm este în mod similar scăzută, dar explicația este diferită: 1) datorită specializării fiziologice extreme impusă celulei în cursul dezvoltării prin diferențiere sînt funcționale în celulele eucariote numai un număr limitat de gene structurale; 2) ARNm este mult mai stabil, deoarece la organismele evoluat celulele trăiesc într-un mediu intern mai constant prin compoziția sa chimică și nevoile de adaptare promptă sînt considerabil mai mici. La eucariote, în general, ARNm citoplasmatic are o serie de particularități caracteristice, decurgînd din prezența la extremitatea sa $5'$ a unei secvențe 7-metil-guanozintrifosfat numită de autorii englezi „cap” (fr. „chapeau”), indispensabilă pentru inițierea traducerii și așezarea corectă a ARNm pe ribosomi (Kozak, 1979). Dovada o constituie faptul că ARNm bacterian nu este tradus în celulele eucariote decît după adăugarea unei secvențe „cap” artificiale, iar ARNm de tip eucariot a cărui secvență „cap” a fost îndepărtată încetează a mai fi tradus. Celălalt capăt al ARNm eucariot, capătul $3'$ -hidroxil-, are atașat un polimer lung de 20–250 nucleotide, formînd „coada” poli-A a cărei funcție specifică nu este cunoscută. Ea ar servi, probabil, pentru menținerea stabilității intracelulare a ARNm specific și ar influența chiar metabolismul acestuia.

Rolul biologic al ARNm. La nivel molecular ARNm reprezintă o „transcriere” chimică a codului din ADN, constituit din dezoxiribonucleotide, în termeni de ribonucleotide. El asigură transpunerea informației genetice într-un mesaj care poate fi „citit” de dispozitivul celular de sinteză a proteinelor și „tradus” într-un lanț polipeptidic cu o anumită secvență a aminoacizilor. Această concepție asupra rolului biologic al ARNm este sprijinită de următoarele fapte descoperite pe cale experimentală; a) încetarea sintezei proteinelor *in vitro* în urma inactivării ARNm; b) dependența directă a activității de sinteză a ribosomilor de legarea de ei a ARNm; c) modificarea structurii proteinei prin modificarea structurii ARNm; d) mărirea de circa 20 de ori a vitezei de sinteză a proteinelor prin adăugarea de ARNm la extractele aceluare deficitare în acest tip de ARN; e) posibilitatea de dirijare a sintezei proteinelor cu ajutorul

unor mesageri sintetici, în sensul încorporării specifice a unor anumiți aminoacizi, conform corespondenței în termeni de cod genetic dintre ARN mesager și proteina sintetizată.

După Grunberg-Manago (1974), viteza de creștere a ARNm este de $\sim 410-440$ nucleotide/minut/per moleculă de enzimă ($3 \mu\text{g}$ de enzimă pot sintetiza $3,8 \mu\text{g}$ de ARN cu g.m. de $5,4 \times 10^5$ dal în 8 min.). Creșterea ARNm este inhibată de actinomicina D, antibiotic ciclopeptidic, care se fixează pe matrița ADN, împiedicând deplasarea enzimei.

Transcrierea genetică este un proces mai complicat decât replicarea : spre deosebire de ADN polimerază, care trebuie să recunoască și să copieze egal ambele catene ale ADN d.c., transcriptaza trebuie să deosebească cele două catene, să recunoască și să copieze numai una și numai începând de la un anumit situs dat. Aceasta explică și structura mult mai complexă a ARN polimerazei.

Evidențierea transcrierii genetice. „Genele în acțiune”

Deși Tremblay și colab. (1969) au evidențiat cei dintii prezența unor structuri complexe formate din membrane, ADN și ARN în curs de sinteză, este meritul lui Miller Jr. și colab. (1970, 1973) de a fi demonstrat că microscopia electronică poate reprezenta o tehnică foarte utilă pentru studiile de genetică la nivel molecular. Procesul de transcriere a informației genetice a fost studiat în special în oocitul de amfibieni (*Triturus viridescens*), precum și la bacteriile *E. coli* și *Salmonella typhimurium*. La celulele eucariote, în general, cu excepția posibilă a organitelor intracitoplasmice care conțin ADN (cum sînt mitocondriile și cloroplastele), procesele de transcriere și de traducere a informației genetice sînt separate în timp și spațiu : ARN polimeraza transcrie ADN în nucleu, după care diferitele specii de ARN, implicate în traducerea informației genetice, migrează în citoplasmă, unde are loc sinteza proteinelor.

Transcrierea genetică la bacterii. Evidențierea transcrierii genetice la bacterii a fost făcută fie cu ajutorul unor tulpini mutante cu peretele celular fragil, fie prin tratarea celulelor de tip sălbatic, pentru scurt timp, cu lizozim codificat de fagul T4, la rece ($+4^\circ\text{C}$). Celulele osmotice sensibile au fost lizate prin diluție în apă distilată și examinate la microscopul electronic, după fixare cu formol și colorare cu acid fosfotungstic. Șocul osmotice determină eliberarea unei mari cantități de material genetic, care apare sub forma unor mase de fibrile fine, de care sînt atașate șiraguri de granule. Fiecare granulă are un diametru de $\sim 20-25$ nm, reprezentînd mărimea aproximativă a ribosomilor izolați de la *E. coli* (Hill și colab., 1969). Fibrilele sînt degradate prin tratarea cu DNază, iar șiragurile de granule sînt îndepărtate prin expunere la RNază.

Bazat pe aceste date, Miller Jr. (1970) a ajuns la concluzia că granulele reprezintă ribosomii bacterieni, iar fibrilele porțiuni ale cromosomului *E. coli*. Diametrul ADN cromosomal evidențiat în acest fel este de $\sim 4,0$ nm, respectiv dublu față de cel măsurat prin microscopie electro-

nică de Hall (1956), precum și de Beer și Zobel (1961). Deoarece acidul fosfotungstic nu se leagă de ADN, este probabil că această îngroșare este datorată faptului că ADN este acoperit cu proteine. Diametrul mărit uniform al cromosomului pledează împotriva ipotezei unei legări nespecifice a proteinelor în cursul izolării. Microelectronografiile furnizează o serie de detalii privind procesul de transcriere și traducere genetică la bacterii, indicând direcția sintezei de ARNm și de proteine.

Utilizând tehnica menționată au fost evidențiate lungi segmente cromosomale active, cuprinse între cea mai scurtă moleculă de ARNm (avind un singur ribosom legat) și cel mai lung poliribosom. Aceste regiuni, avind o lungime de $\sim 3 \mu\text{m}$, conțin suficientă informație genetică pentru a codifica mai multe proteine și corespund — deși nu sînt identificate — aproape sigur unui segment policistronic al genomului, respectiv unui operon mare. Spre comparație este de menționat că operonul triptofan al *E. coli* alcătuit din cinci gene are $2,32 \mu\text{m}$ (Imamoto și Ianofsky, 1967), iar operonul histidină format din nouă gene structurale are $\sim 3,75 \mu\text{m}$ (Benzinger și Hartman, 1962). Imaginile obținute permit definirea limitelor unui operon structural, care este cuprins între poliribosomul cel mai scurt (corespunzînd situsului promotor) și poliribosomul cel mai lung, care corespunde punctului terminus al operonului. Fiecare poliribosom este legat de cromosom printr-o moleculă de ARN polimerază, care transcrie informația genetică în momentul izolării. Moleculele de ARN polimerază apar sub forma unor granulații slab colorate, cu diametrul de $7,5 \text{ nm}$, mai mici și mai neregulate decît ribosomii individuali (fig. 155).

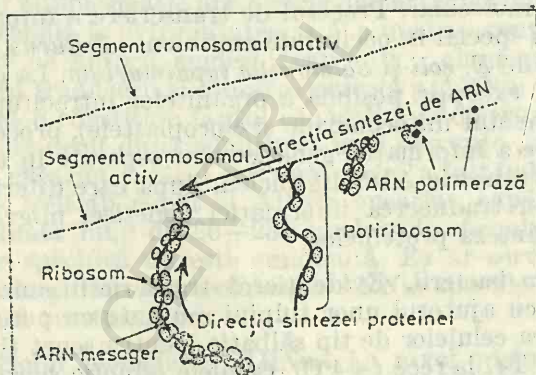


Fig. 155. — Gena bacteriană în acțiune. Schema prezintă două segmente de cromosom de la *E. coli*, dintre care unul, activ, este transcris la ARNm și tradus la proteine. Molecula de ARNm cea mai lungă a fost sintetizată prima (după Miller Jr., 1973).

În unele cazuri se văd subunitățile ribosomale 30 S și 50 S. Moleculele de ARNm sînt asociate în special cu subunitățile 30 S, fapt care confirmă datele biochimice (Moore, 1966). Ribosomii de pe moleculele de ARNm legate de genom apar ca ribosomi individuali sau ca poliribosomi, cu un gradient de dimensiuni de la scurți la foarte lungi. De regulă se observă circa zece molecule de ARNm în curs de transcriere, separate unele de altele prin distanțe variabile. Cele mai lungi au ~ 20 de ribosomi. Studiul imaginilor obținute demonstrează, de asemenea, că ribosomii situați la extremitatea nou sintetizată a ARNm sînt strîns adiacenți moleculelor de ARN polimerază. De asemenea, ei sînt strîns apropiați de-a lungul poliribosomilor. Această aranjare structurală are rolul de a proteja ARNm pe cale de sinteză de atacul enzimelor endonucleolitice. Miller Jr.

și colab. (1970, 1973) au arătat că prin compararea numărului de ribosomi dintr-un polisom cu distanța relativă de la situsul de inițiere a sintezei există posibilitatea de a aprecia lungimea medie a moleculei de ARNm asociată cu ribosomul. În caleul este necesar să se țină seama de faptul că atunci când este transcris $1 \mu\text{m}$ de ADN dublu catenar, în conformația B, dă naștere unei molecule de ARN m.c., care, dacă este complet întinsă, măsoară $2 \mu\text{m}$. Bazându-se pe mai multe măsurători, Miller Jr. (1971) apreciază că fiecare ribosom este asociat cu un segment de ARNm, lung de $\sim 100-150 \text{ nm}$, respectiv cu $\sim 150-200$ de nucleotide. Ținând seama de faptul că diametrul ribosomului nu poate proteja decât $\sim 1/20$ din această cantitate de ARNm, s-a ajuns la concluzia că acesta nu este com-

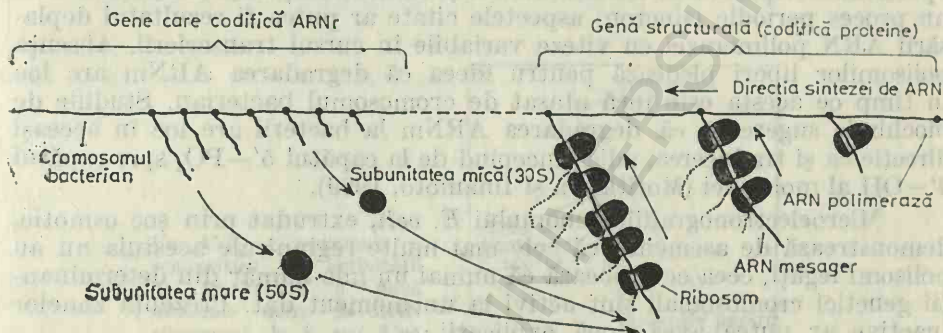


Fig. 156. — La procariote, transcrierea și traducerea genetică au loc simultan. ARN ribosomal este transcris de la două gene aparent contigue pe anumite segmente ale cromosomului bacterian (stînga). ARNm transcris după gene situate în alte situri este tradus imediat în proteine la nivelul ribosomilor (dreapta) (după Miller Jr., 1973).

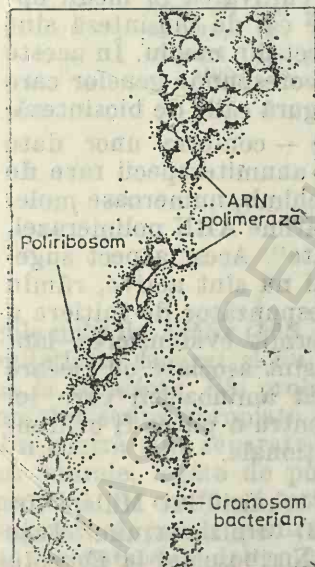


Fig. 157. — Reprezentarea schematică, după o electronografie (colorație negativă cu acetat de uranil), a proceselor de transcriere și traducere genetică asociate la *E. coli* (după Miller Jr., 1973).

plet extins, ci mai degrabă intens răsucit în configurația polisomului normal. Legarea permanentă a poliribosomilor de ADN în strînsă asociere cu molecula de ARN polimerază pledează pentru cuplarea proceselor de transcriere și traducere genetică în timp și spațiu, în mod coordonat (fig. 156, 157).

În felul acesta sînt confirmate datele lui Caro și Forno (1961), care, utilizînd tehnica autoradiografiei unor secțiuni fine de celule bacteriene, au demonstrat că sinteza ARN este localizată aproape de regiunile celulare bogate în ribosomi și în vecinătatea nucleoidului, ce conține cea mai mare parte din ADN celular. De asemenea, sînt confirmate probele biochimice furnizate de Stent (1964), precum și de Byrne și colab. (1964), care au ple-dat pentru cuplarea transcrierii genelor structurale la ARNm cu traducerea acestuia la proteine. Existența unor spații cu dimensiuni inegale între polisomii adiacenți sugerează că inițierea transcrierii genetice este un proces asincron, așa cum au demonstrat studiile biochimice efectuate de Baker și Ianofsky (1970), referitor la frecvența de inițiere a transcrierii operonului triptofan la *E. coli*. În cazul în care inițierea transcrierii este un proces periodic (sincron) aspectele citate ar putea fi rezultatul deplasării ARN polimerazei cu viteze variabile în cursul transcrierii. Absența polisomilor liberi pledează pentru ideea că degradarea ARNm are loc în timp ce acesta este încă atașat de cromosomul bacterian. Studiile de biochimie sugerează că degradarea ARNm la bacterii are loc în aceeași direcție ca și traducerea, adică începînd de la capătul 5'-PO₄ spre capătul 3'-OH al moleculei (Moritkawa și Imamoto, 1969).

Microelectronografiile genomului *E. coli*, extrudat prin șoc osmotic, demonstrează de asemenea că cele mai multe regiuni ale acestuia nu au polisomi legați, ceea ce probează că numai un mic număr din determinanții genetici cromosomali sînt activi la un moment dat. Prezența zonelor inative ar putea avea două explicații:

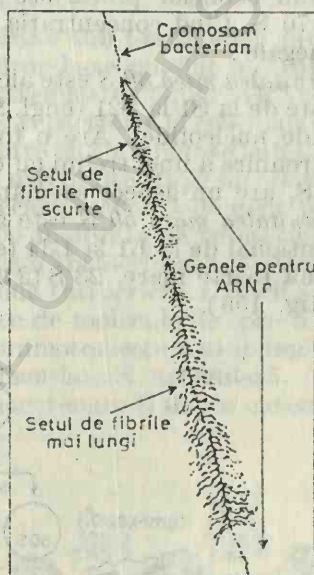
- 1) Bacteriile studiate au fost obținute prin cultivarea în medii optime, respectiv în condiții în care cele mai multe căi de biosinteză sînt repesate, deoarece toți nutrienții sînt preluați direct din mediu. În aceste condiții, regiunile „inactive” din genom ar putea corespunde genelor care în mod normal codifică biosinteza enzimelor ce asigură căile de biosinteză.

- 2) Regiunile inative ar putea corespunde — conform unor date experimentale mai noi — unor gene care codifică anumite specii rare de ARNm sau care nu ar fi transcrise niciodată. În schimb, numeroase molecule cu aspect de granule neregulate, similare ca mărime ARN polimerazei, sînt asociate cu aceste regiuni cromosomale „tăcute”. Acest aspect sugerează că unele molecule de ARN polimerază, deși nu sînt active, rămîn asociate cu genomul în așteptarea semnalului corespunzător de inițiere a transcrierii genetice. Microelectronografiile nu permit evidențierea lanțurilor polipeptidice care cresc și care, probabil, sînt asociate cu fiecare ribosom. Acest fenomen este datorat faptului că aminoacizii care le formează sînt molecule prea mici și prea simple pentru a putea fi evidențiate cu mijloacele microscopiei electronice convenționale.

Genele pentru ARN ribosomal. Utilizarea tehnicii lui Miller Jr. (1970, 1971) a permis lui Hamkalo și Miller (1973) furnizarea unor date referitoare la activitatea genelor care codifică ARN ribosomal la *E. coli*. Informațiile referitoare la aceste gene sînt în general puține și destul de contradictorii. Purdom și colab. (1970) au calculat, pe baza observațiilor decurgînd din procesele de renaturare a moleculelor de acizi nucleici, că numărul regiunilor care codifică ARNr în cromosomul *E. coli* ar fi de cinci pînă la șapte. După Doolittle și Pace (1971), cistronii care codifică ARNr

16S, ARNr 23S și ARNr 5S ar fi grupați strins în această ordine, într-o regiune a cromosomului, apreciată de Birnbaum și Kaplan (1971) ca având o lungime de 30 μm . Miller Jr. (1973) a arătat că aspectul genelor pentru ARNr aflate în activitate de transcriere la *E. coli* este foarte diferit de cel al genelor structurale. În timp ce ARNm transcris după genele structurale este legat de poliribosomi, ARNr în curs de formare, care nu este tradus, este complexat cu proteine, dar nu apare niciodată legat de ribosomii maturi. Imaginile electronoptice evidențiază prezența a două seturi alcătuite din $\sim 60-70$ de fibrile contigue, corespunzând activității de transcriere a celor două molecule mari de ARNr 16S și 23S. Unul din segmente este aproape de două ori mai lung decît celălalt și împreună măsoară $\sim 1,5 \mu\text{m}$ (fig. 158). Datele obținute demonstrează că cele două mole-

Fig. 158. — Reprezentarea schematică a activității de transcriere a două molecule mari de ARN ribosomal la *E. coli*. Una dintre ele este de aproape două ori mai mare decît cealaltă, iar împreună măsoară $1,5 \mu\text{m}$ (după Miller Jr., 1973).



cule mari de ARNr (16S și 23S) prezente în ribosomii de tip procariot sînt sintetizate separat și nu sînt obținute prin clivarea unui precursor unic, ca la eucariote. Ele probează, în plus, că genele pentru ARNr la *E. coli* nu sînt strîns apropiate unele de altele pe cromosom, ca la eucariote, ci din contră sînt separate prin segmente cromosomale alcătuite din gene structurale, legate de poliribosomi, aflați în plină activitate de sinteză proteică. Se confirmă astfel ipoteza lui Spadari și Ritossa (1972), care au sugerat că genele pentru ARNr din structura cromosomului bacterian ar fi separate de determinanți genetici „neribosomalii”. Hamkalo și Miller Jr. (1973) au stabilit pe bază de calcul că în condiții optime de creștere, pentru a sintetiza întreaga cantitate de ARNr necesar pentru o multiplicare rapidă, fiecare regiune pentru ARNr trebuie transcrisă simultan de $\sim 80-90$ molecule de ARN polimerază.

Traducerea informației genetice

Biosinteza propriu-zisă a proteinelor este un proces complex în cursul căruia informația conținută în ADN, transmisă la ribosomi prin intermediul ARNm, este „tradusă” într-o secvență polipeptidică prin asamblarea aminoacizilor într-o ordine specifică, prescrisă de informația genetică. Acest proces implică activitatea mai multor constituenți ai „mașinăriei” celulare de sinteză a proteinelor și evoluează în mai multe etape.

Rolul ribosomilor. Ribosomii sînt structurile cele mai complexe ale traducerii genetice, deoarece reprezintă punctul de întîlnire a diferiților constituenți implicați în biosinteza proteinelor. Ei au un rol esențial, de adevărate „fabrici” de proteine, datorită capacității de a se lega reversibil atît de ARNm, cît și de ARNt.

Ribosomii celulelor procariote au \varnothing de 20–25 nm și constanta de sedimentare 70 S. Cînd concentrația Mg^{2+} scade, ei se disociază în două subunități inegale :

1) *Subunitatea mică 30 S* este alcătuită din 21 de molecule de proteine diferite, notate de la S1 la S21 (engl. Small = mic), și o moleculă de ARNr 16 S (1 542 de nucleotide). Are o formă alungită și o regiune îngustată la nivelul de reunire a unei treimi cu celelalte două treimi. Așezată pe subunitatea 50 S, are un aspect asemănător unui receptor de telefon.

2) *Subunitatea mare 50 S* este alcătuită din 34 de proteine diferite, notate convențional de la L1 la L34 (engl. Large = mare), și două molecule de ARNr : una foarte mare, 23 S (2 904 de nucleotide), și alta 5 S (120 de nucleotide) (fig. 159).

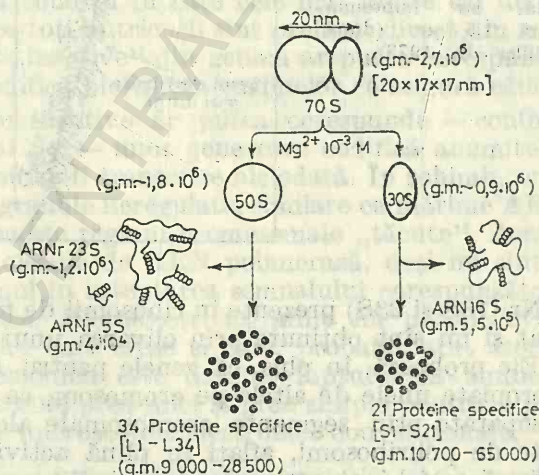


Fig. 159. — Structura moleculară a ribosomilor bacterieni.

Formarea ribosomilor implică sinteza ARN și a proteinelor ribosomale și asamblarea lor în structuri mecanochimice funcționale. Reglarea celor două mecanisme de sinteză asigură formarea constituenților ribosomali în cantități corespunzătoare necesităților de morfogeneză. În plină perioadă de creștere, *E. coli* sintetizează ~500 de ribosomi pe minut

(celulele animale produc $\sim 3\,000$). În funcție de starea fiziologică a celulei, numărul ribosomilor 70 S variază între 15 000 și 100 000 (în medie 20 — 30 000).

ARN ribosomal. ARNr reprezintă $\sim 2/3$ din masa ribosomilor și $\sim 80\%$ din ARN total. Este predominant cantitativ din cauza vitezei mari de sinteză și a stabilității sale. La *E. coli*, sinteza ARNr se face prin transcrierea unor gene diferite pentru cele trei tipuri de ARNr. Genele pentru ARNr 16 S și 23 S sint, după unii autori, adiacente și transcrise succesiv, în timp ce genele pentru ARNr 5 S sint situate la distanță. Aceste date sint contrazise de unele observații efectuate prin microscopie electronică (Miller Jr. și colab., 1973). Fiecare genă este prezentă în 6 copii la *E. coli* și în 10 copii la *B. subtilis*.

Numărul genelor ribosomale din celulele eucariote este variabil și totdeauna mai mare (160 la *S. cerevisiae*, 200 la *Neurospora* etc.) (Chapeville și Haenni, 1974).

Moleculele de ARNr sint sintetizate sub forma unor precursori ceva mai lungi decât ARNr activ și ale căror baze nu sint metilate. ARNr 5S are un excident de câteva baze la extremitatea 5', iar ARNr 16 S și 23 S au ~ 200 de nucleotide suplimentare, repartizate la cele două extremități. Ulterior, secvențele de baze excedentare sint amputate sub acțiunea unor nucleaze puțin cunoscute (probabil în mai multe etape succesive), iar bazele sint metilate de enzime specifice. Fiecare secvență de gene pentru ARNr este transcrisă concomitent de ~ 100 molecule de transcriptază, situate unele lângă altele, deoarece imediat ce o transcriptază părăsește promotorul, alta îi ia locul pentru a iniția o nouă transcriere. Datorită acestui fapt, moleculele de transcriptază sint legate de molecule de pre-ARNr, cu atât mai lungi cu cît poziția lor față de promotor este mai îndepărtată.

ARNr are o configurație tridimensională neregulată, datorită prezenței alternative a unor regiuni monocatenare și dublu catenare în regiunile cu complementaritate (fig. 160).

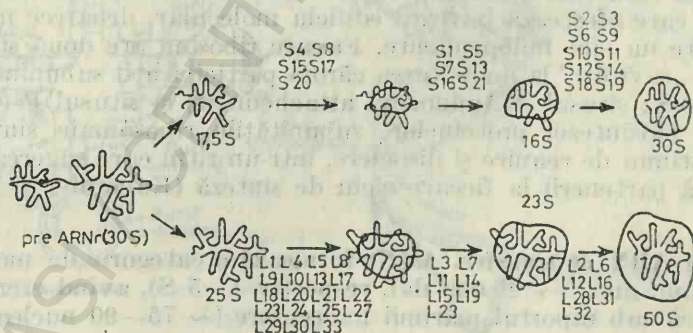


Fig. 160. — Căile de asamblare a ribosomilor 30 S și 50 S. Numerele indică denumirile proteinelor ribosomale (după Watson, 1977).

ARNr joacă rolul de matriță în special în primele etape ale asamblării ribosomilor, permițind așezarea într-o ordine precisă a proteinelor ribosomale. În fazele tardive ale asamblării intervin interacțiunile proteină — proteină, care devin la fel de importante pentru acest proces.

Funcțiile constituenților ribosomali au fost descifrate parțial prin studierea *in vitro* a unor ribosomi incompleți, lipsiți de unul sau mai mulți constituenți. Faptul că cele 55 de proteine ribosomale se găsesc într-un singur exemplar demonstrează că, spre deosebire de capsidale virale, ribosomii sînt rezultatul unei asamblări disimetrice și sugerează că fiecare proteină are un rol structural și funcțional unic. Unele proteine (S4, S7, S8, S9, S 15) au rol structural, fiind necesare pentru asamblarea subunității 30 S. Altele (S16) facilitează asamblarea, dar nu sînt esențiale, deoarece sinteza proteinelor poate avea loc și în lipsa lor. Alte proteine au un rol funcțional esențial: proteina S1 participă la legarea ARNm, S6, la legarea ARNt-f Met iar S2, S3 și S 14, la legarea aminoacil-ARNt. Proteina L 11 a subunității 50 S are funcția de peptidiltransferază, în timp ce L 7 și L 12 stimulate de S 5 și S 9 situate la interfața dintre cele două subunități 30 S și 5 S fac hidroliza GTP dependentă de factorul FE—G. În sfîrșit, prin asamblarea lor tridimensională, proteinele formează situsuri stereospecifice noi, permițînd legarea în poziții corecte a ARNm, a aminoacil-ARNt, fixarea factorilor proteici și a subunităților mici și mari (Stöffler și Stöffler-Meilicke, 1984). ARNr 16 S de la *E. coli* are *in vitro* un rol esențial în asamblarea structurii întregii subunități (Nomura 1971), deoarece particulele 30 S biologic active sînt reconstituite numai în prezența lui. ARNr 5 S este singurul cu rol funcțional datorită faptului că are o secvență scurtă, complementară față de o secvență comună tuturor speciilor de ARNt. El ar interacționa cu moleculele de ARNt, legîndu-le de subunitatea 50 S într-un proces stimulat de proteinele L 7 și L 12.

În ansamblu, rolul ribosomilor este de a menține atît matrița de ARNm, cît și aminoacil-ARNt într-o orientare mutual corespunzătoare pentru a asigura citirea corectă a informației genetice și formarea legăturilor peptidice. În cursul sintezei proteinelor, conformația ribosomilor este modificată prin „intrarea” și „ieșirea” factorilor adiționali, ca și de energia eliberată prin hidroliza GTP. Datorită acestor particularități, ribosomii sînt *in vivo* structuri dinamice, supuse unor modificări conformaționale complexe, care afectează întregul edificiu molecular, deoarece moleculele componente nu sînt independente. Fiecare ribosom are două situsuri de legare sau „cavități” la delimitarea cărora participă atît subunitatea 30 S, cît și cea 50 S: situsul A (Aminoacyl attachment) și situsul P (Peptidil). În cursul biosintezei proteinelor, subunitățile ribosomale sînt într-un proces continuu de reunire și disociere, într-un ritm care sugerează că ele își schimbă partenerii la fiecare ciclu de sinteză (Kaempfer și Meselson, 1969).

Rolul ARN de transfer. ARNt formează o categorie de molecule de ARN cu g.m. mică ($\sim 25\,000$ dal, respectiv 4—5 S), avînd eterogenitate relativ mică sub raportul mărimii moleculare (~ 75 —90 nucleotide) și o structură secundară și terțiară destul de complicată. Este aparent solubil în citoplasmă și *in vitro*, în condiții corespunzătoare celor de izolare a macromoleculelor prin precipitare, caracter care ar fi mai curînd de ordin biologic decît fizicochimic. Are particularitatea de a fi parțial bicatear, dar porțiunea sa dublu catenară rezultă din „îndoirea” în „ac de păr” și legarea bazelor complementare ale unei molecule monofilare.

Primele cercetări asupra structurii secundare a ARNt pentru alanină, izolat de la levuri (Halley, 1965), au evidențiat existența unei molecule bidimensionale, în formă de frunză de trifoi. Ulterior, acest fel de structură a fost întâlnit la peste 100 de tipuri de ARNt, izolate din celule bacteriene, vegetale și animale. Această structură secundară rezultă din legarea covalentă a unui număr important de baze, care formează „brațe” (engl. „stem”) dublu catenare, întrerupte de zone monocatenare sub formă de bucle („loop”). Deși numărul, tipul și anumite secvențe de baze diferă chiar la ARNt care leagă același aminoacid, cele mai multe nucleotide ocupă aceleași poziții și au aceeași secvență de nucleotide, la toate tipurile de ARNt. Numărul nucleotidelor este constant în diferitele „brațe” și „bucle” ale moleculei, cu excepția segmentului α și β din bucla D și al buclei variabile care poate conține 4—20 de nucleotide. Structura brațelor, a buclelor și a regiunii constante par să aibă același caracter de universalitate ca și codul genetic (Rich, 1982).

Fig. 161 prezintă schematic structura ARNt—alanină din levuri, alcătuit din 77 nucleotide și 9 baze neobișnuite, care diferă de cele normale prin prezența uneia sau mai multor grupări metil, cu rolul probabil de a împiedica formarea de structuri în ac de păr. Prezența unor secvențe de bază comune tuturor tipurilor de ARNt asigură un singur mod de pliere

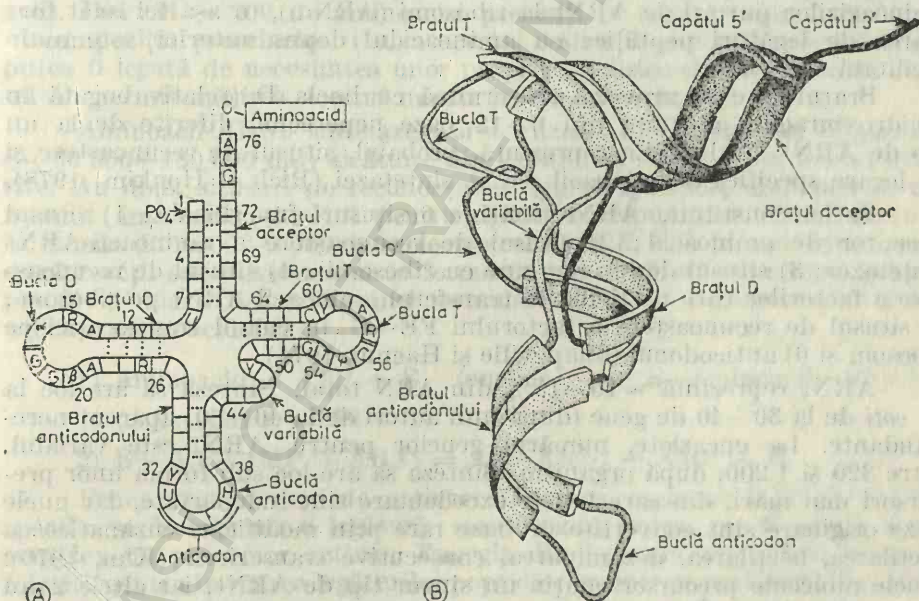


Fig. 161. — A. Modelul general de structură bidimensională „în frunză de trifoi” al ARNt. Dedus inițial din studiul ARNt—alanină de la levuri, a fost găsit corespunzător pentru ~100 tipuri de ARNt de la bacterii, plante și animale. A — adenozină; G — guanozină; C — citidină; U — uridină; R — adenozină sau guanozină; I — citidină sau uridină; T — ribotimidină; ψ — pseudouridină; H — adenozină sau guanozină modificată. B. Modelul de structură helicală corespunzând celor patru „brațe” ale schemei din A. Cele două regiuni helicale sînt aranjate în unghi drept, realizînd o așezare structurală în formă de L.

a lanțului, permite formarea unui număr maxim de baze și realizarea configurației în frunză de trifoi. Deși proprietățile ARNt depind de configurația sa tridimensională, anumite funcții sînt corelate, în primul rînd, cu secvența de baze și cu structura anumitor regiuni ale moleculei, care prezintă următoarele particularități: Capătul 3' terminal al moleculei este monocatenar și comun tuturor tipurilor de ARNt. El se termină cu secvența —CCA și formează situsul acceptor de aminoacid sau situsul de legare aminoacil. La acest capăt, una din grupările hidroxil (3') ale ribozei, din nucleotidul adenină terminal, servește ca acceptor, de care se leagă covalent numai un anumit aminoacid. Specificitatea legării este controlată de enzima aminoacil—ARNt sintetaza. Situsul acceptor se continuă cu brațul acceptor, apoi cu brațul T și bucla T*, care conține 7 baze nepereche și o secvență 5'—GT ψ CC—3'. Ea reprezintă situsul de recunoaștere ribosomal al tuturor moleculelor de ARNt, deoarece formează perechi de baze cu o secvență complementară a ARN 5 S, care asigură legarea ARNt „încărcat” cu aminoacidul corespunzător de ribosom.

Urmează o buclă cu dimensiuni variabile, bucla variabilă, cu funcție necunoscută, apoi brațul și bucla anticodonului, alcătuită din 7 baze nepereche, între care se găsește tripleta anticodon, încadrată între o purină spre capătul 3' și o secvență U-pirimidină spre capătul 5'.

Anticodonul este expus în buclă, la o distanță uniformă de ~6,6nm de capătul acceptor 3'. Constanța acestei distanțe asigură dispunerea aminoacizilor purtați de ARNt la ribosomi (ARNm), în așa fel încît formarea de legături peptidice cu aminoacidul depus anterior este mult facilitată.

Brațul D care urmează se termină cu bucla D (relativ bogată în dihidroxiuracil), alcătuită din 6—12 baze nepereche, diferite de la un tip de ARNt la altul. Ea reprezintă, probabil, situsul de recunoaștere și de legare specifică a aminoacil-ARNt sintetazei (Rich și Houkim, 1978).

Astfel constituit, ARNt conține 6 situsuri funcționale: 1) situsul acceptor de aminoacid; 2) situsul de recunoaștere a aminoacil-ARNt sintetazei; 3) situsul de interacțiune cu ribosomii; 4) situsul de recunoaștere a factorilor care participă la transferul aminoacil-ARNt pe ribosom; 5) situsul de recunoaștere a factorului FE—G în cursul translocăției pe ribosom și 6) anticodonul (Chapeville și Haenni, 1974).

ARNt reprezintă ~10—15% din ARN total. Sinteza sa are loc la *E. coli* de la 30—40 de gene (după unii autori de la 40—80) aparent nere-dundante. La eucariote, numărul genelor pentru ARNt este variabil, între 320 și 1 200, după organism. Sinteza sa are loc sub forma unor precursori mai mari, din care bazele excedentare sînt îndepărtate, iar unele baze originare sînt convertite în baze rare prin modificări enzimactice ca metilarea, acetilarea, dezaminarea, consecutive transcrierii (Kim, 1976). Unele molecule precursor conțin un singur tip de ARNt, iar altele 2 sau mai multe tipuri. În primul caz, „prelucrarea” anterioară participării lor în biosinteza proteinelor este limitată la îndepărtarea nucleotidelor excedentare „străine”, de la cele două extremități, în timp. În al doilea, are

* Diferitele regiuni poartă denumiri după bazele modificate prezente la nivelul lor: T de la timidină, D de la dihidroxiuracil etc. Timina prezintă constant în structura ADN și ARNt lipsește totdeauna din ARNm și ARNr, în care este înlocuită de uracil.

loc un proces de clivare endonucleotidică a moleculelor dimer, cu separarea moleculelor de ARN funcționale identice sau diferite (de ex., ARNt prolină și ARNt serină) (Seidman și Mc Clain, 1975). În foarte multe cazuri există mai multe tipuri de ARNt (ARNt izoacceptor) pentru același aminoacid, ca, de exemplu, 5 tipuri de ARNt pentru leucină la *E. coli*.

„Activarea” aminoacizilor. Formarea legăturilor peptidice este condiționată de activarea prealabilă a fiecărui aminoacid și de „așezarea” lui pe un situs ribosomal specific, dirijată de ARNm legat de ribosom. Legarea aminoacizilor de ARNt sub acțiunea ARNt-aminoacil sintetazelor specifice este considerată ca etapa cea mai importantă și mai sofisticată a traducerii genetice. Ea este denumită și „prima traducere”, deoarece aminoacidul legat de ARNt își pierde „identitatea” și nu mai este recunoscut decât prin intermediul ARNt purtător (Chapeville și Rouget, 1972). A „doua traducere” are loc pe ribosom, ca un proces mai simplu, bazat pe recunoașterea codon—anticodon. Secvența trinucleotidică (codonul) de pe ARNm, care definește poziția aminoacidului în polipeptid nu „recunoaște” aminoacidul, ci numai secvența de nucleotide a anticodonului.

Aminoacil-ARNt sintetazele. Activarea aminoacizilor și formarea complexului aminoacil-ARNt este efectuată datorită prezenței în fiecare celulă a cel puțin 20 de enzime specifice (câte una pentru fiecare tip de aminoacil). Din cei ~ 200 de aminoacizi prezenți în natură, numai 20 intră în compoziția proteinelor. Cauza acestei restricții este necunoscută și ar putea fi legată de necesitatea unor proprietăți fizico-chimice precise, care nu au permis mărirea acestui număr în cursul evoluției.

Aminoacil-ARNt sintetazele sînt enzime monomere sau oligomere (~ 90 000—180 000 dal) alcătuite din subunități identice sau uneori diferite. Au două situsuri de recunoaștere riguros specifice, unul pentru un anumit aminoacid și altul pentru ARNt corespunzător. Sînt prezente în număr de 2 000—3 000 de molecule/celulă la *E. coli*, la care efectuează două reacții succesive ce duc la formarea unei legături ester între gruparea 2'—3' hidroxil a adenozinei terminale a ARNt și gruparea α carboxilică a aminoacidului :

- 1) Aminoacid + ATP + E (enzima) $\xrightleftharpoons{Mg^{2+}}$ E—aminoacil—adenilat
(AA—AMP) + PPi
- 2) E—AA—AMP + ARNt \rightleftharpoons AA—ARNt + AMP + E

Prima reacție este de activare. Legarea aminoacidului de ARNt specific se face printr-o legătură macroergică, ceea ce face din acest complex un precursor activat. Energia din legătura respectivă poate fi folosită pentru formarea legăturilor peptidice cu energie mai joasă (fig. 162).

Fazele procesului de traducere genetică

Traducerea genetică este un proces complex implicind participarea a ~ 200 de macromolecule diferite, dintre care ~ 50% sînt reprezentate de ARNt și de sintetaze (Chapeville și Haenni, 1974), cărora li se adaugă

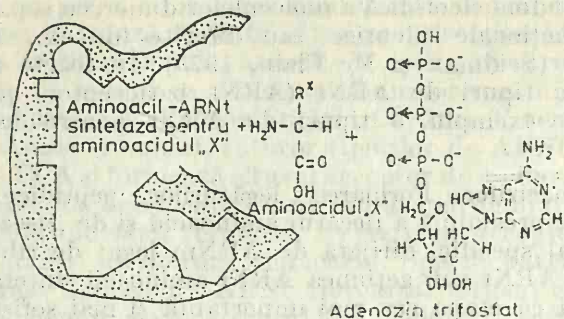
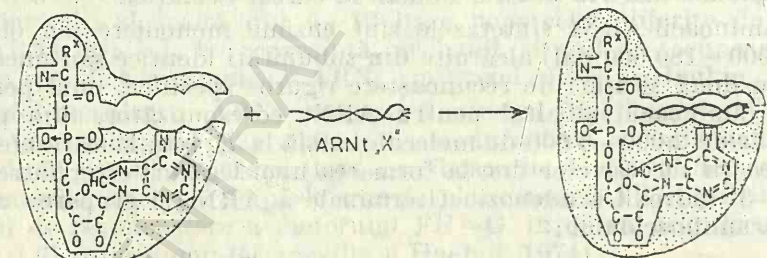
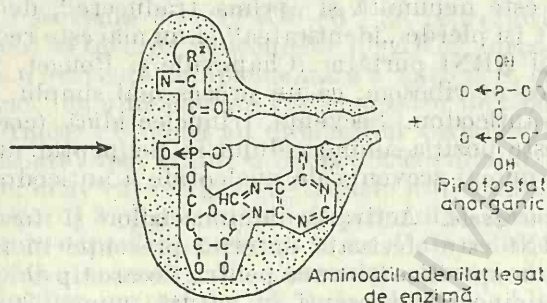


Fig. 162. — Legarea aminoacidului „X” la adenozin trifosfat de către o enzimă activatoare specifică aminoacidului respectiv. Figura reprezintă schematic faptul că enzima aminoacil sintetaza „X” are situsuri specifice de recunoaștere pentru moleculele de ATP și pentru aminoacidul specific pe care îl activează. Pentru simplificarea, unii atomi de H au fost omiși din figură (după Strickberger, 1976).



Aminoacil adenilat legat de enzimă

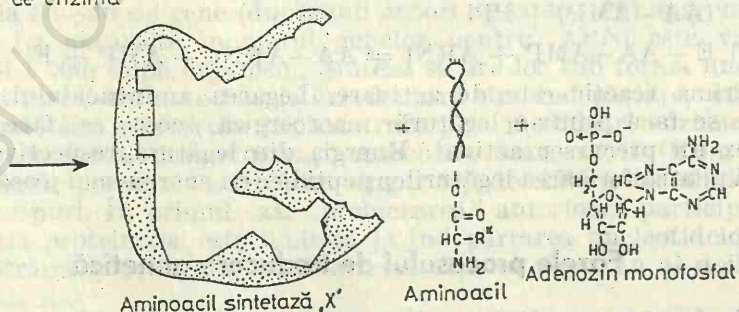


Fig. 163. — Transferul aminoacidului „X” la ARNt*. Aminoacil-ARNt sintetaza „X” are un situs specific care recunoaște numai ARNt*. Din cauza specificității sale numai pentru aminoacidul „X” și ARNt* doar aminoacidul „X” se leagă de ARNt* (după Strickberger, 1976).

o serie de factori adiționali, specifici fiecărei etape, al căror rol se exercită prin legarea lor de ribosomi (fig. 163). El evoluează în trei faze succesive: 1) inițierea sintezei; 2) creșterea lanțului polipeptidic; 3) terminarea sintezei și eliberarea polipeptidului.

Inițierea sintezei proteinelor

Este un proces complicat datorită necesității de a asigura legarea corectă a ARNt inițiator, care determină traducerea fidelă a mesajului genetic. Procesul implică trei procese de recunoaștere macromoleculară: 1) selecția ARNt inițiator; 2) selecția codonului inițiator pe ARNm; 3) interacțiunea ARNm și ARNt inițiator cu ribosomul încă neangajat în sinteza proteinelor. Procesul necesită intervenția a trei factori proteici de inițiere (FI-1, FI-2 și FI-3), având funcții specifice (tabelul nr. 26), care nu sînt constituenți ai ribosomilor, ei suferă reacții ciclice de legare și eliberare din structura acestora.

Tabelul nr. 26

Factorii adiționali necesari traducerii ARNm activi pe ribosomii de *E. coli*

Faza de acțiune	Denumirea factorului *	G.m. (daltoni)	Acțiunea *
Inițierea sintezei	IF-1	8 119	Stimulează inițierea, recunoașterea regiunii de inițiere, reciclarea IF-2 și disocierea ribosomilor 70 S
	IF-2	90 000	Legarea f-Met-ARNt de subunitatea 30 S (15) și activitatea GTP-azei
	IF-3	20 668	Legarea ARNm de subunitatea 30 S, factor de anti-asociere
Creșterea lanțului polipeptidic	EF-Tu	47 000	Legarea aminoacil-ARNt de ribosomii 70 S și activitatea GTP-azei
	EF-Ts	34 000	Regenerarea complexului EF-Tu.GTP
	EF-G	83 000	Translocația și activitatea GTP-azei
Terminarea sintezei	RF-1	44 000	Terminarea creșterii lanțului polipeptidic și eliberarea ARNt de acil; activitatea GTP-azei
	RF-2	47 000	
	RF-3	23 000	Factor de eliberare a ribosomilor

* IF - Initiation factor; EF - Elongation factor; Tu - Temperature unstable (termolabil); Ts - Temperature stable; RF - Release factor.

Primul eveniment al acestei etape este legarea subunității 30 S de codonul inițiator al ARNm și formarea unui complex de inițiere. La *E. coli* și la procariote, în general, inițierea sintezei se face prin legarea N-formilmetionin-ARNt (f-Met-ARNt^{fMet}). Formilarea metioninei are loc sub acțiunea unei transformilaze, care leagă gruparea ($-\text{CH}=\text{O}$) de

atomul de N (α -amino-) al metioninei, după ce aminoacidul s-a legat de ARNt respectiv (Marcker și Sanger, 1964). Prin acest mecanism, N-formil-metionina (N-f-Met) este limitată la funcția de aminoacid N-terminal, deoarece nu poate forma legături peptidice cu carboxilul terminal al altor aminoacizi.

După legarea ei într-un polipeptid, N-f-Met este îndepărtată prin acțiunea peptidazelor. Codonul inițiator AUG al ARNm codifică semnalul inițiator (start) când este situat la începutul ARNm și ca urmare leagă f-Met-ARNt^{Met} și metionina obișnuită când este situat în alte localizări, în interiorul ARNm. Această ambivalență se realizează prin trei mecanisme:

1) Există două tipuri de metionil-ARNt (ARNt_i—inițiator și ARNt_m—de mijloc), care poartă același anticodon (UAC), dar diferă ca secvență de baze (fig. 164); dintre ei doar primul este recunoscut de enzima formilantă.

2) Factorii adiționali, activi în etapa de creștere a polipeptidului nu formează complexe cu f-Met-ARNt, ci numai cu Met-ARNt. Ca urmare, în prezența unui codon AUG situat „intern”, numai acesta este legat de situsul ribosomal.

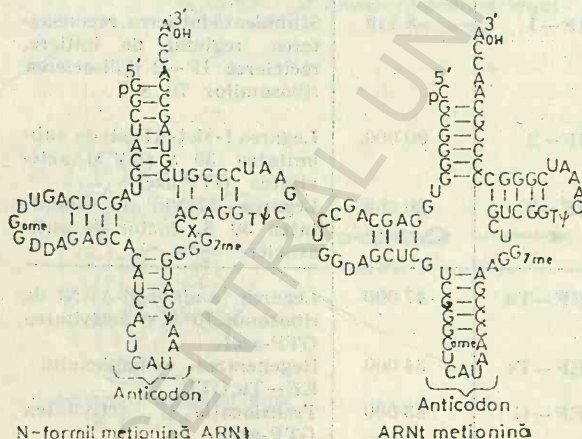
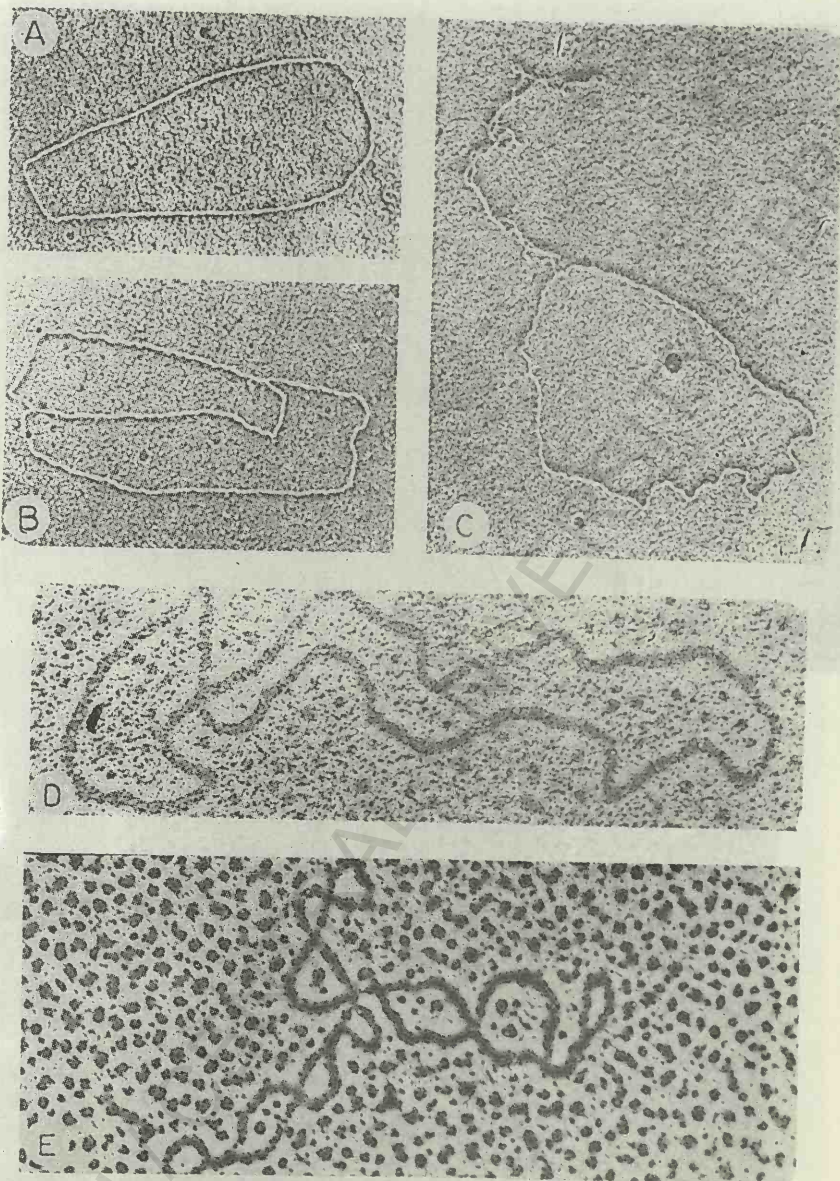


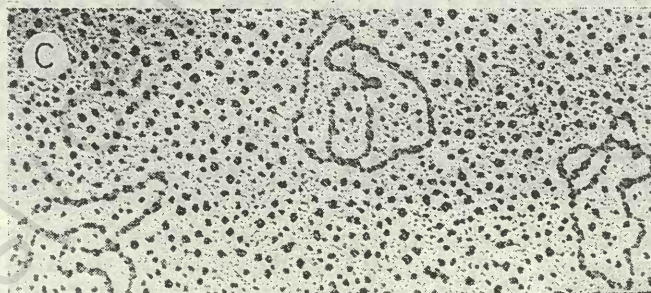
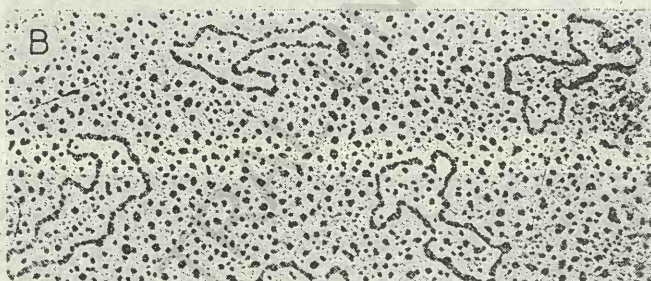
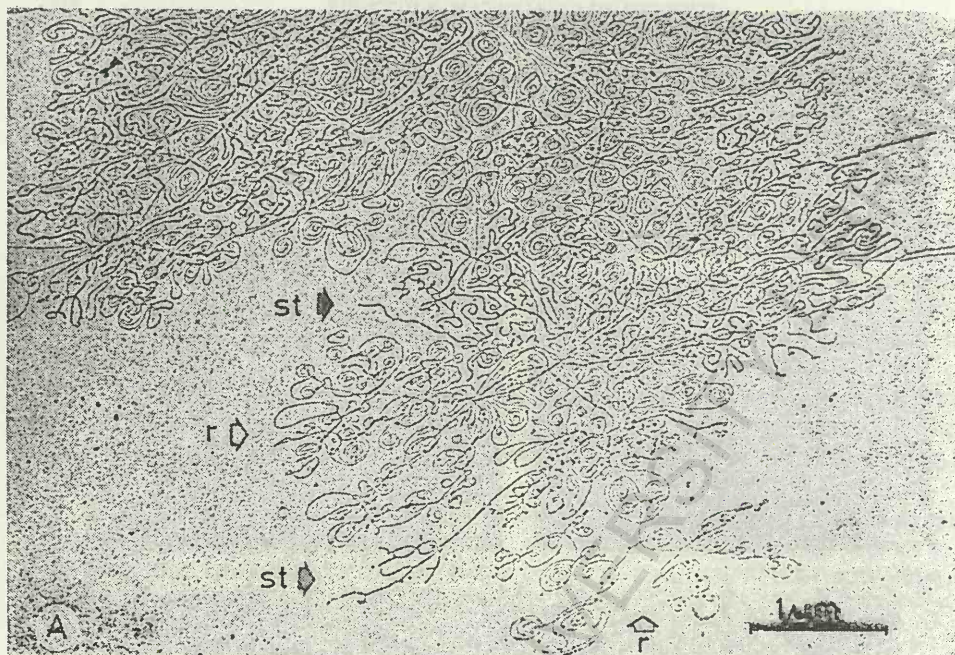
Fig. 164. — Structura ARNt care plasează N-formilmetionina ca aminoacid inițial în catenele polipeptidice, comparativ cu cea a ARNt care introduce metionina în interiorul lanțului polipeptidic. *Gomē* — acid 2'-O-metilguanilic; *Comē* — acid 2'-O-metilcitolilic; X — nucleotid neidentificat; ψ — pseudouridină.

3) Întrucât codonul AUG codifică metionina, indiferent de poziția acesteia în lanțul polipeptidic, pentru a asigura fidelitatea traducerii, subunitatea ribosomală are nevoie de un semnal adițional pentru a deosebi AUG inițiator de AUG intern în ARNm. Acest semnal este reprezentat la procariote, fagi ca și la unele virusuri animale (SV40, adenovirus etc.) de o secvență anumită — secvența Shine-Delgarno (1974) — situată pe ARNm, la capătul 5'—„ghid” al acestuia, la o distanță de 10—14 nucleotide de codonul AUG (Steitz și Jakes, 1975). Ea conține semnalele de recunoaștere și de legare a ribosomilor.

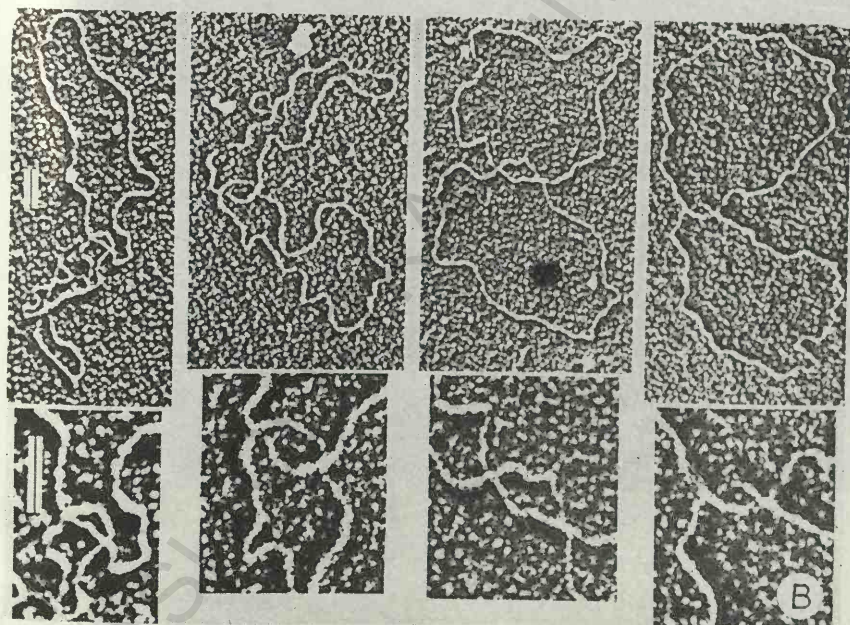
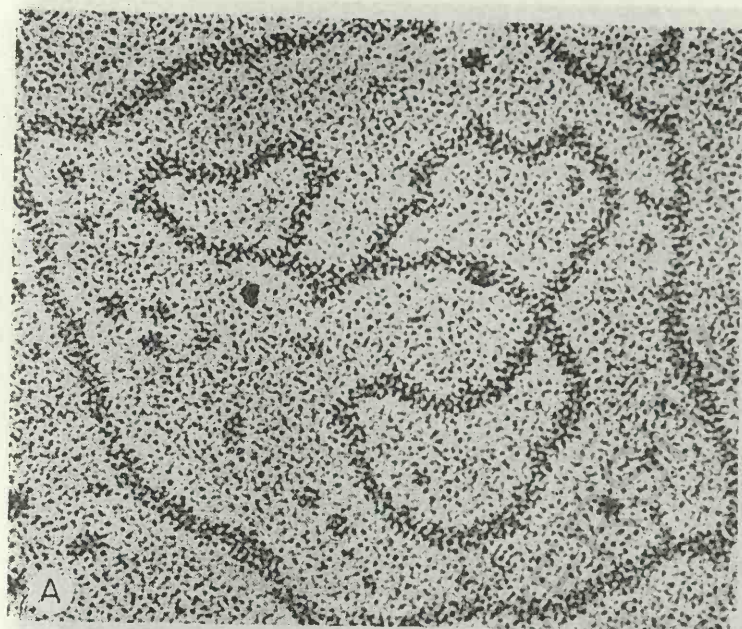
Secvența Shine-Delgarno este necodificatoare („silent”) și conține 3—8 nucleotide complementare față de extremitatea 3' a ARNr al subunității ribosomale 30 S (Ziff și Evans, 1978). Formarea de perechi de baze



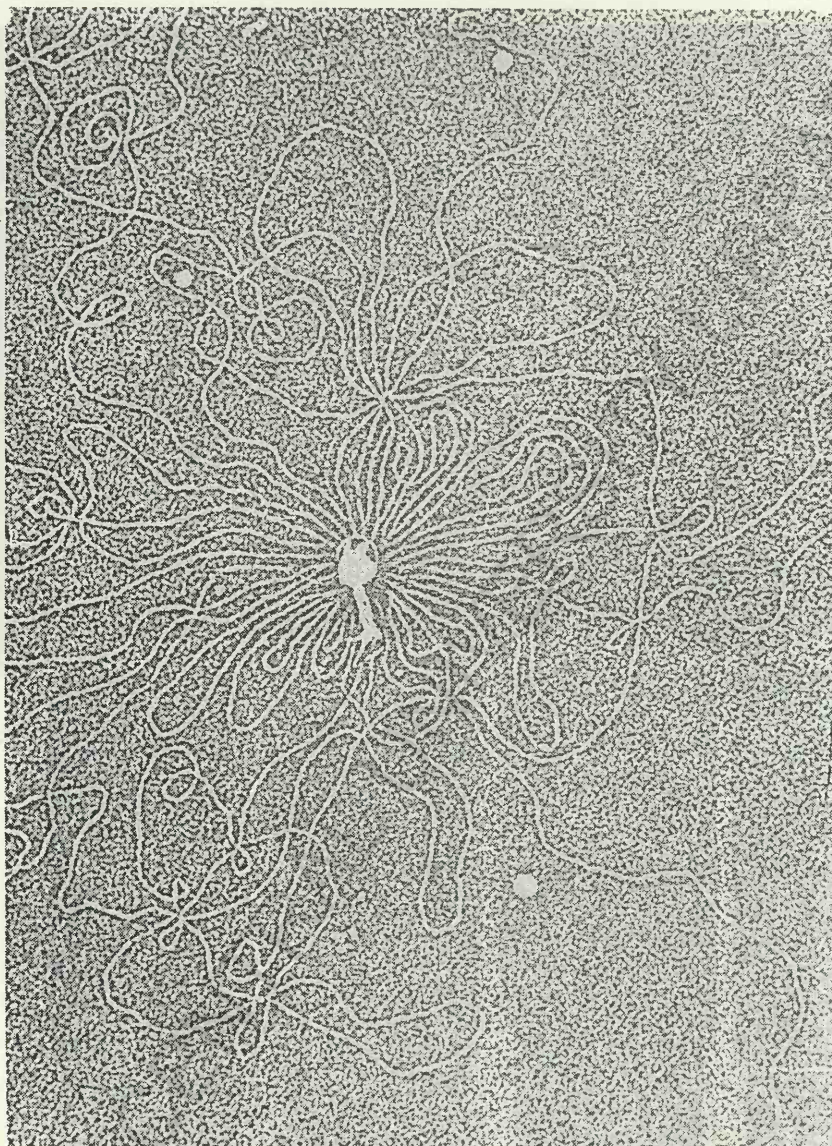
Pl. 1 — Molecule de ADN în formă relaxată și superhelicală. A. Monomer. B. Monomer în curs de replicare. C. Dimer catenat între o formă relaxată și una superhelicală. Lungimea monomerului $\sim 5 \mu\text{m}$. Microelectronografii (după Vinograd, 1980). D. Microelectronografia unei molecule de ADN circulare relaxate a genomului fagului PM2. E. Aceeași moleculă de ADN, în formă suprarăsucită negativ (după Wang, 1982).



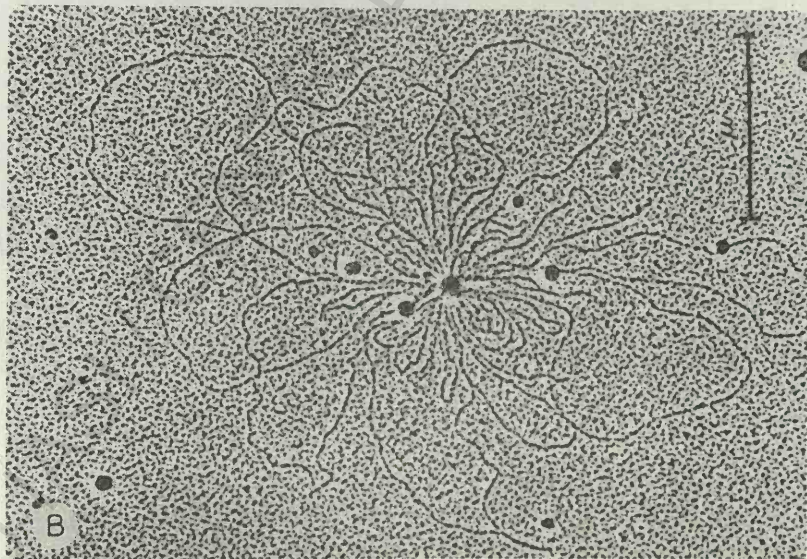
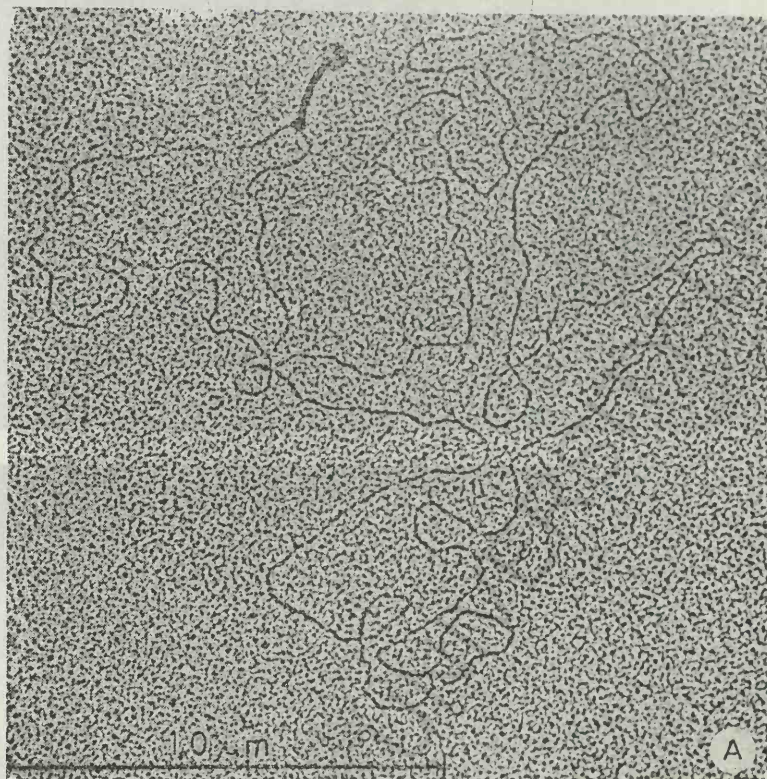
Pl. 2 — A. Cromosom de *E. coli* pliat, după relaxare parțială cu DNază, urmată de dispersie în prezența a 100 μg de bromură de etidiu, care determină fenomene de suprarăsucire. Se observă coexistența unor bucle suprarăsucite (ST) și relaxate (R) (după Delius și Worcel, 1973). Modificările topologice induse de topoizomeraze. B. Microelectronografia unei molecule de ADN m.c. din fagul *fd*. C. Aceleași molecule „innodate” după ce au fost expuse la acțiunea topoizomerazei din *E. coli* (după Wang, 1982).



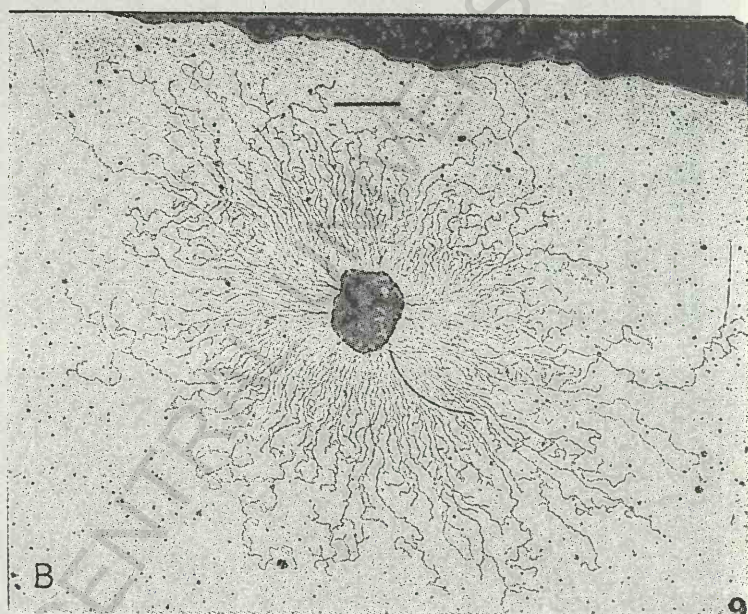
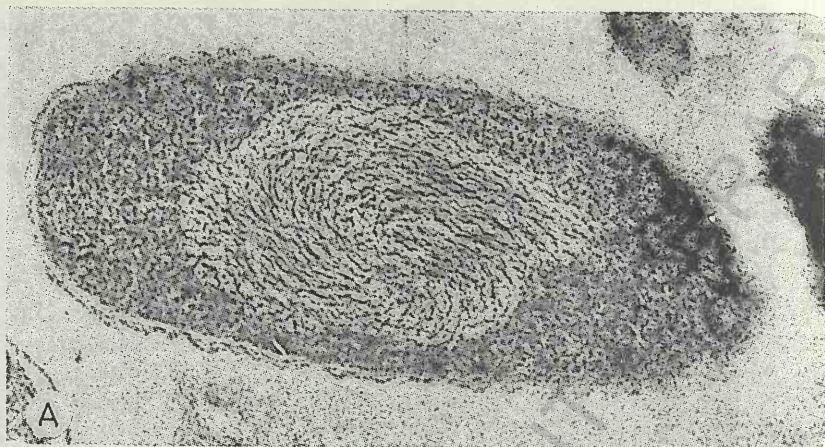
Pl. 3 — A. Genom viral (ADN d.c.) în formă relaxată și parțial relaxată. B. Molecule de ADN d.c. în forme dimere, cu prezentarea în detaliu a regiunii de înălănțuire.



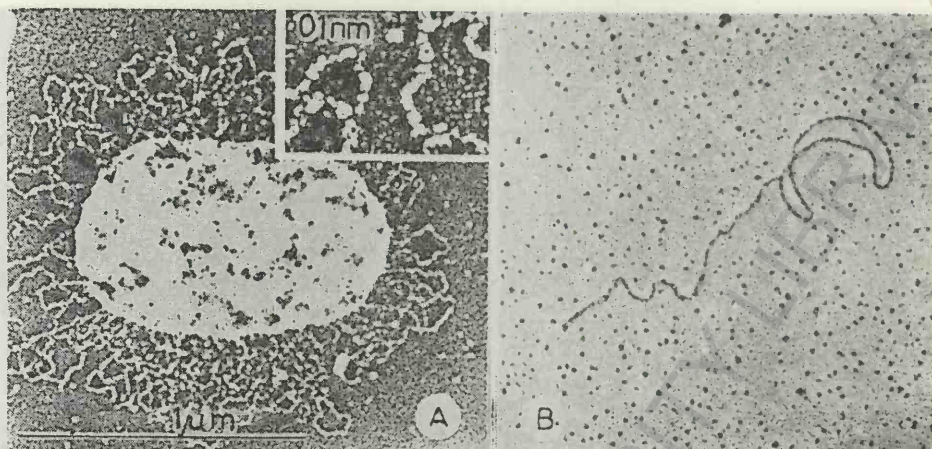
Pl. 4 — Genomul fagului T2 al *E. coli* dispersat în jurul unei particule virale
(după Kleinschmidt, 1962).



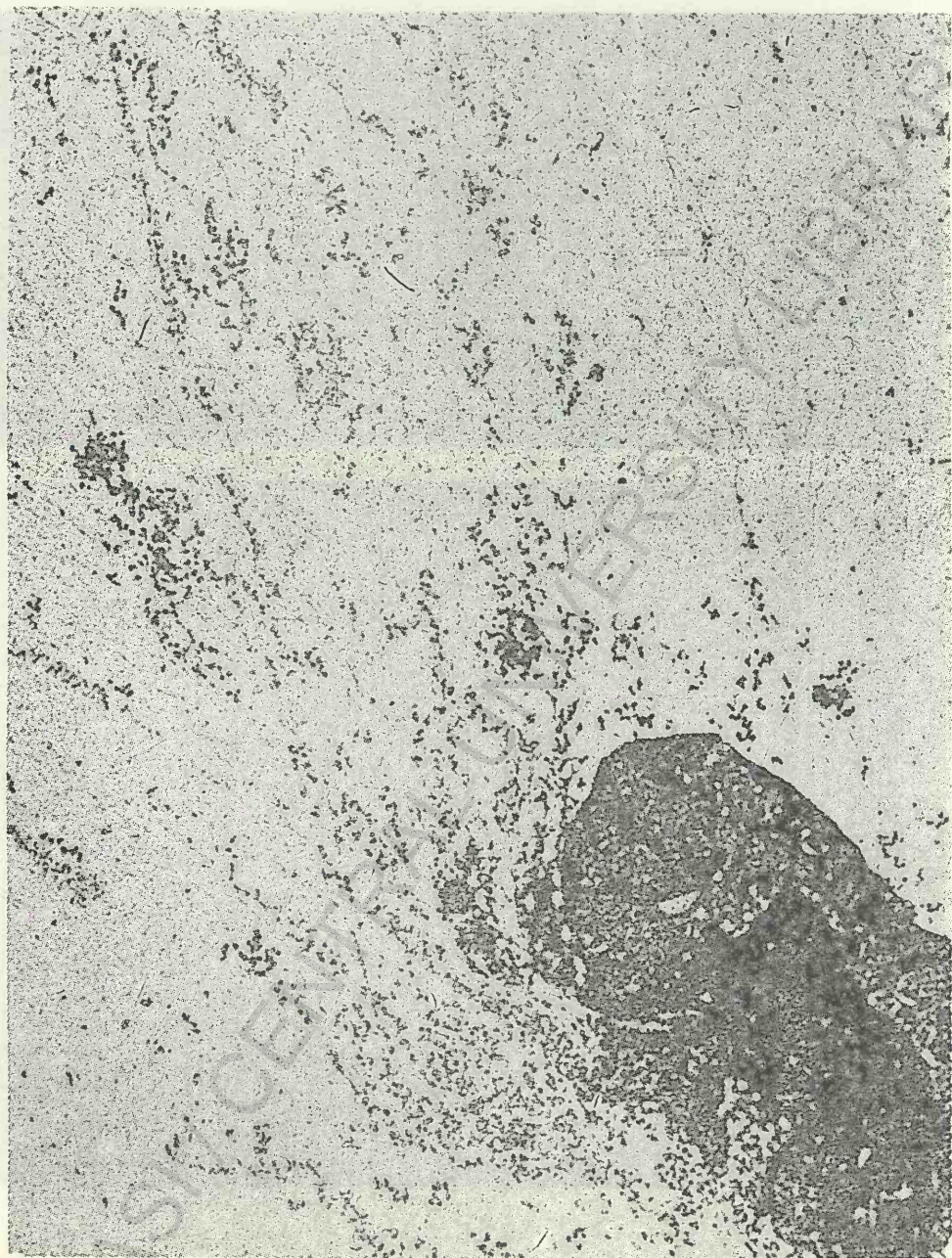
Pl. 5 — A. Genomul fagului λ eliberat din capsidă. B. Genom fagice eliberat din particula virală. Bara = 1 μm .



Pl. 6 — A. Structura fibrilară a nucleoidului la *Agrobacterium tumefaciens* (după Ryter, 1965). B. Cromosom bacterian pliat asociat cu membranele celulare. Imaginea prezintă, în special, fibrele de ADN sub forma unor bucle superhelicale (după Kavenoff și Ryder, 1976). Bara = 1 μ m.

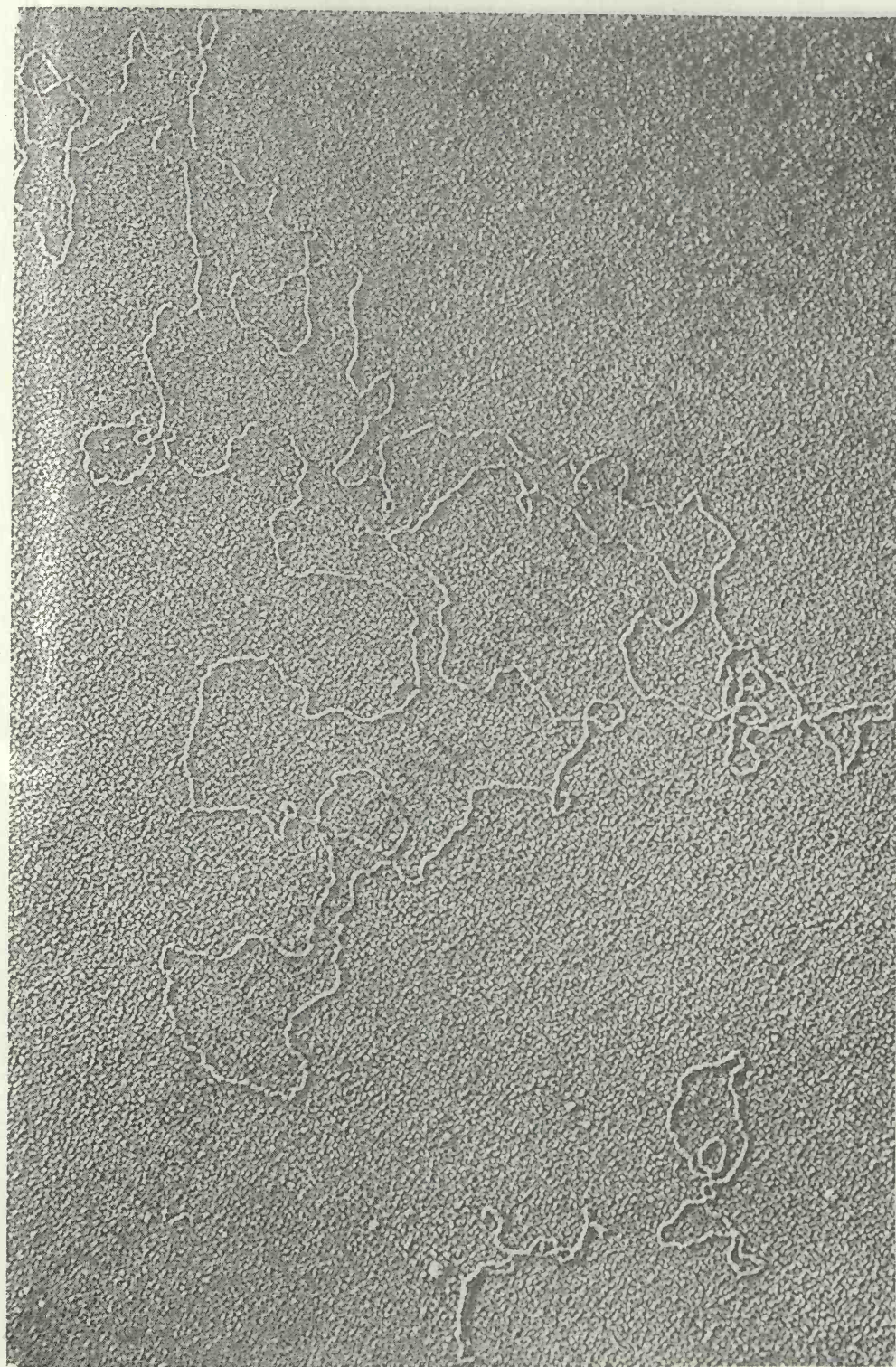


Pl. 7 — A. ADN de *E. coli* cu aspect fibrilar, ca mărele condensate, obținut prin distrugerea celulelor din faza logaritmică tardivă direct pe pelicula suport. În chenar, mărirea unei fibrile lungi de 12 nm (microelectronografie după Griffith, 1976). B. Imaginea unei molecule de ADN m.c. (genomul fagului ΦX174), intermediar de replicare după modelul cercului rotativ (după Dressler și Wolfson, 1978). C. Radioautografia cromosomului de *E. coli*, după marcarea cu timidină tritiată (după Cairns, 1963).

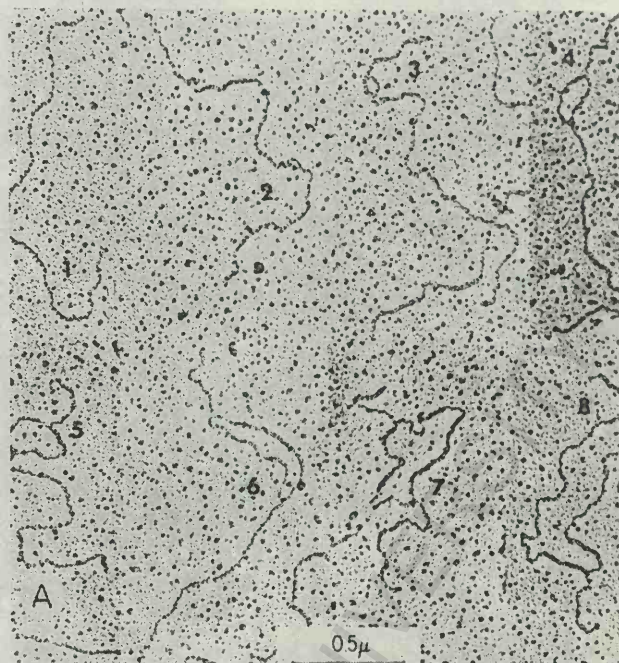


Pl. 8 — Microelectronografia unei celule de *Escherichia coli* dezintegrată prin șoc osmotic, evidențiind restul de perete celular, conținutul celular eliminat, format din fibrile fine (porțiuni din cromosomul bacterian), cu segmente fibrilare corespunzând genelor ribosomale și granule dispuse în șiraguri atașate de ele (poliribosomi) (după O. L. Miller Jr., 1971).

Pl. 9 — Plasmidele R care poartă rezistența la streptomycină. Una este superhelicală, iar cealaltă, ca o buclă dublu helicală incizată monocatenar (după Milliken, 1973).







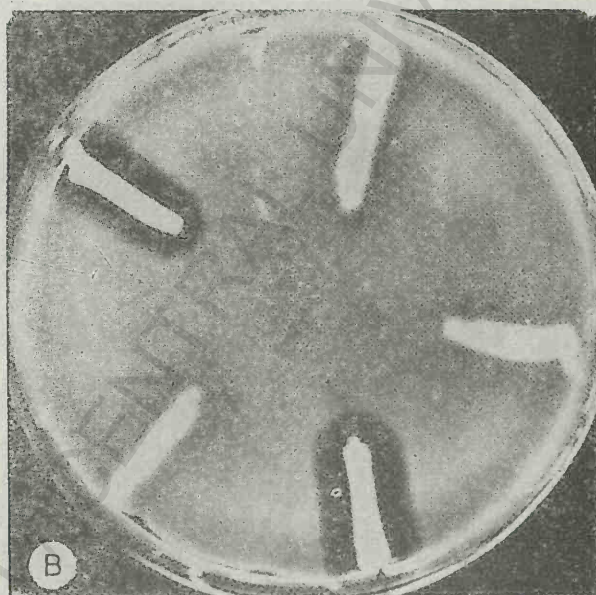
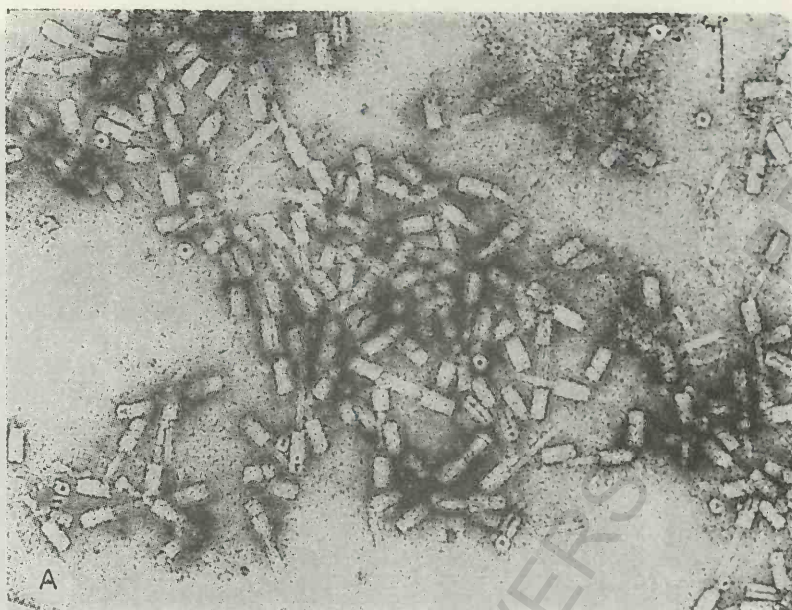
Pl. 11 — A. Plasmide Col convertite la formă lineară, în stare de repaus (1, 2) și în diferite etape ale procesului de replicare (3—8) (după Helinski, 1979).

B. Autoradiografia cromosomului de *Bacillus subtilis*, indicînd replicarea bidimensională (a—g). Se remarcă densitatea mare a granulațiilor la bifurcații după replicare (după Wake, 1973).

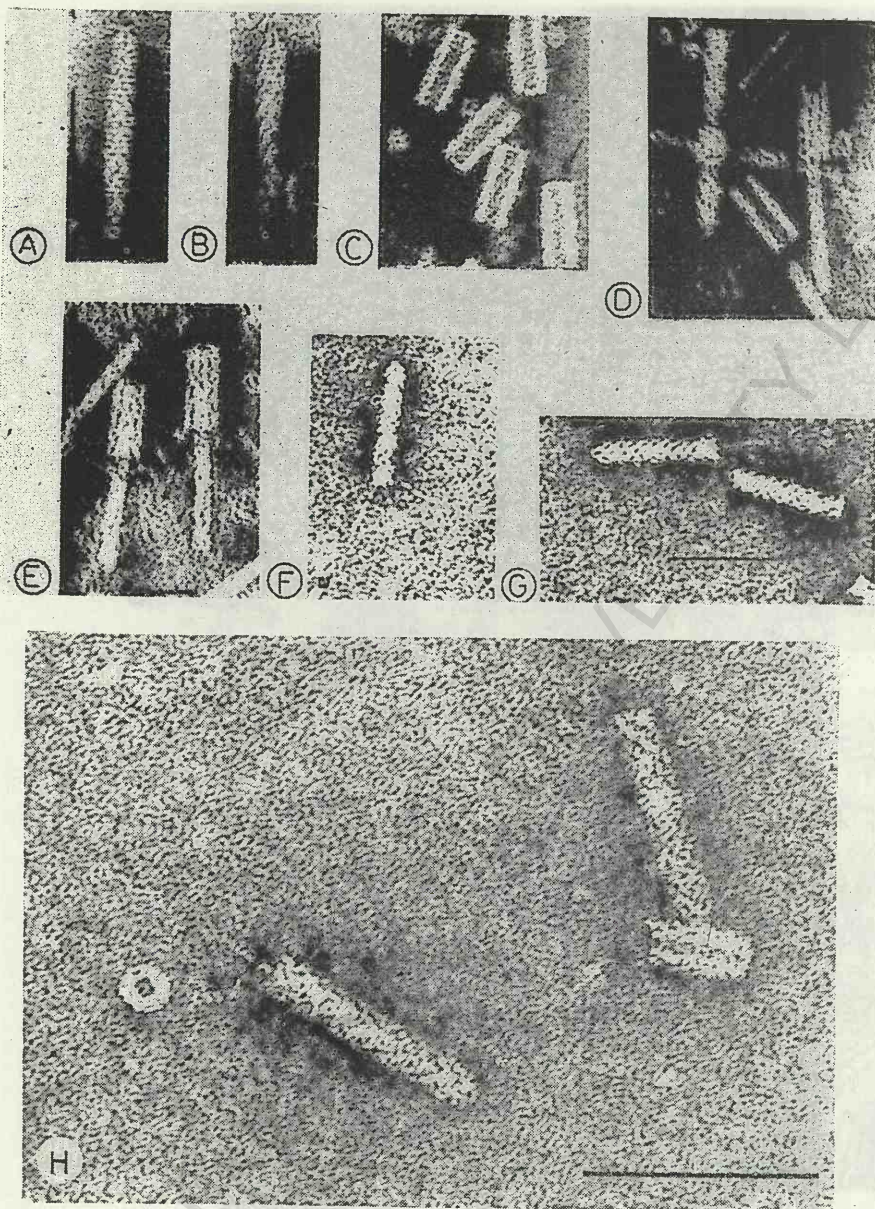
Pl. 10 — Plasmide R umbrite cu vapori de platină. Una dintre molecule este superhelicală, iar cealaltă, relaxată în urma unei incizii monocatenare („nicked duplex loop”) (după Clowes, 1973).



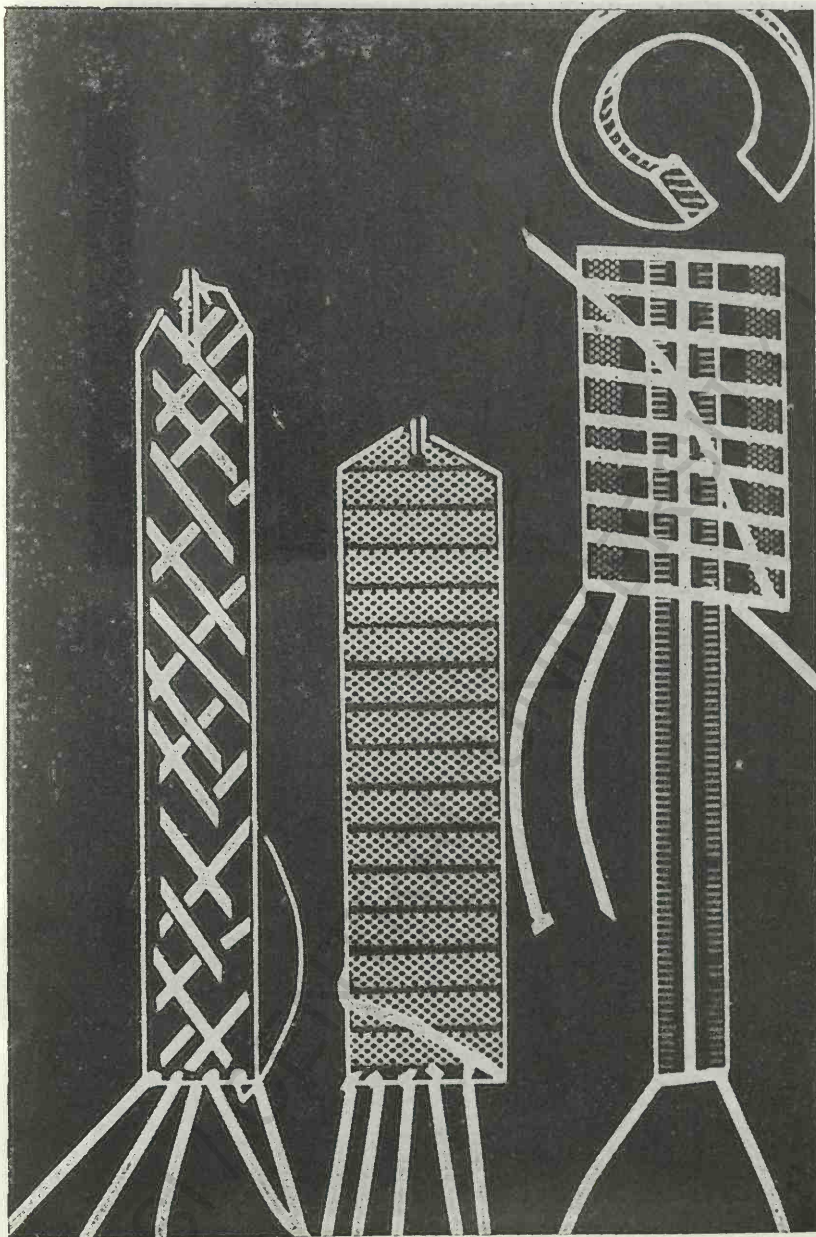
Pl. 12 — A. Piocine purificate tratate cu uree 8 M și colorate cu acetat de uranil. Imaginea prezintă în special „teci” goale și secțiuni transversale. B. Microelectronografia unor forme necontractate sau relaxate de piocine (după Higerd și colab., 1969).



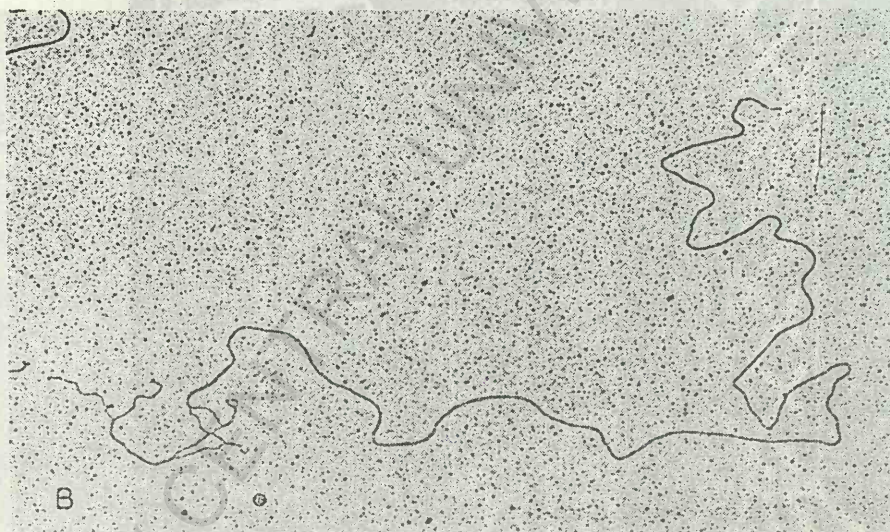
Pl. 13 — A. Piocine. Microelectronografia unor particule cu formă contractată (după Higerd și colab., 1969). B. Evidențierea tulpinilor bacteriene producătoare de colicine (Col^+) (după Trčka și Willinger, 1973).



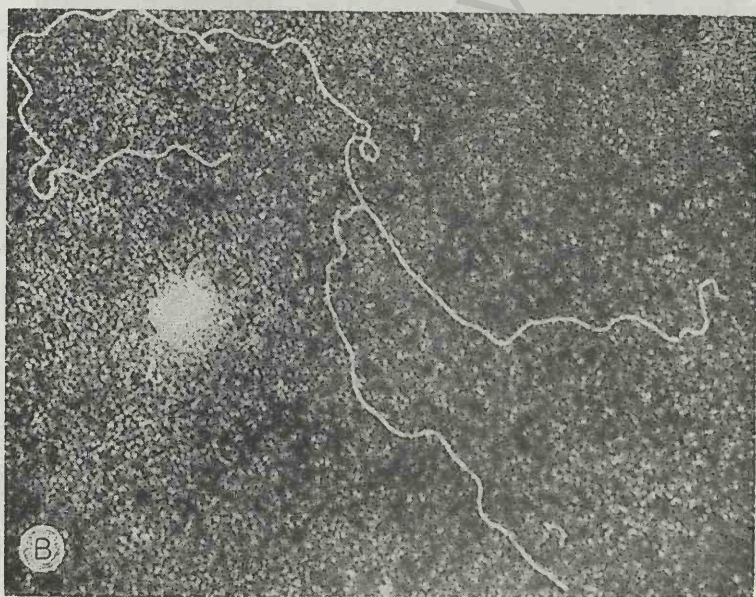
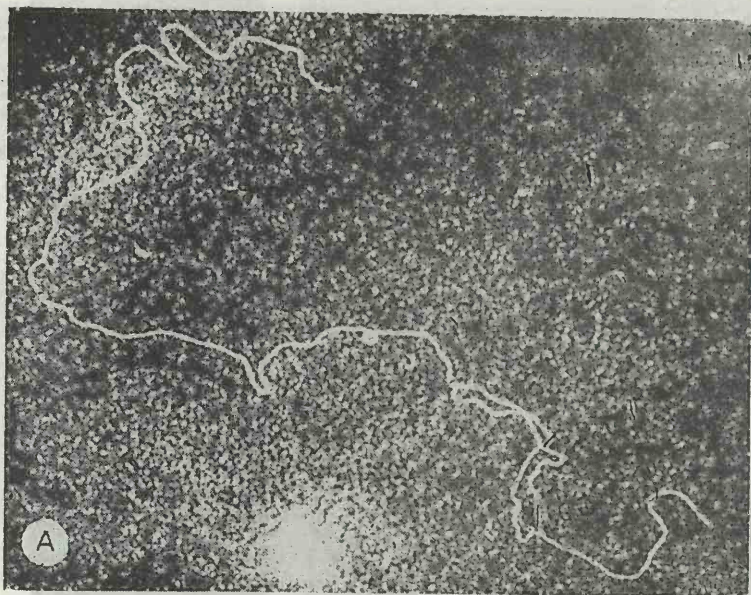
Pl. 14 — Diferite aspecte ale plocinelor în stare relaxată, contractată și pe secțiuni longitudinale și transversale (microelectronografii după Higerd și colab., 1969).



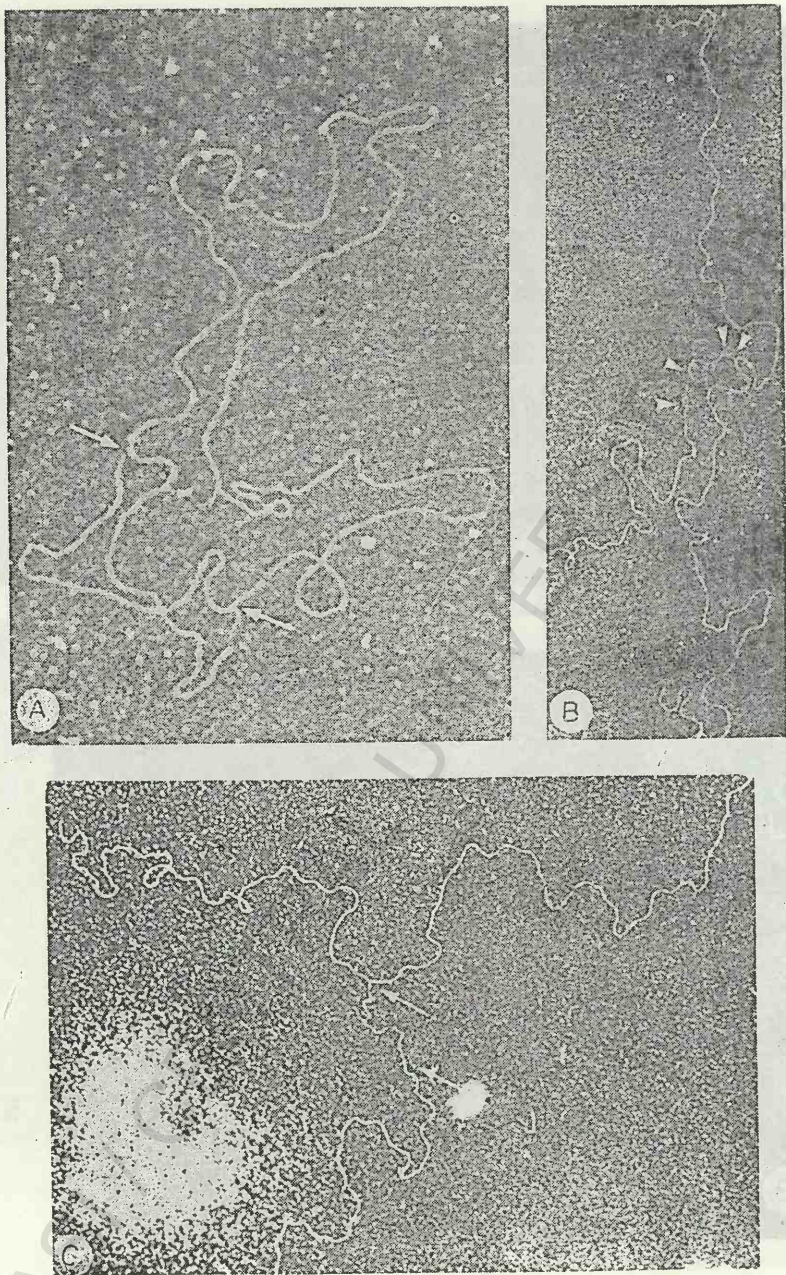
Pl. 15 — Reprezentare schematică a unei molecule de piocină contractată, a două plocine relaxate cu aspect de suprafață diferit și a unei structuri sub formă de „șăibă” (după Higerd și colab., 1969).



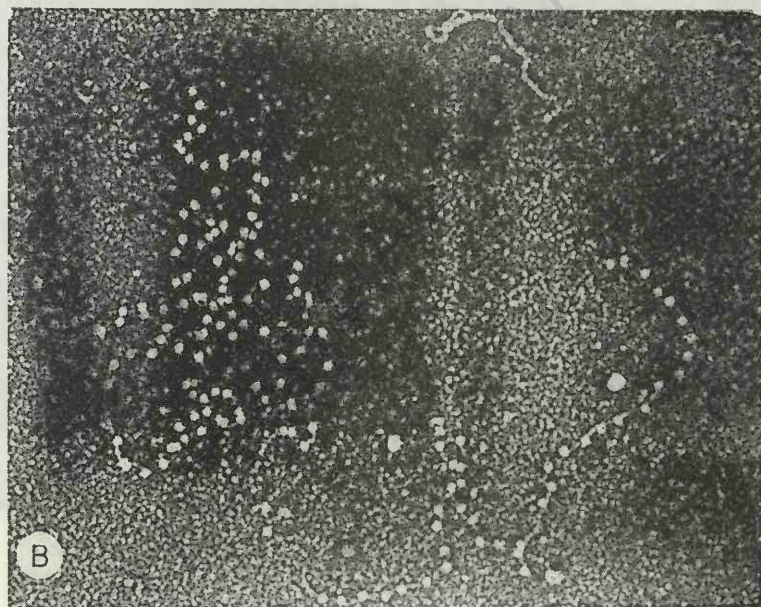
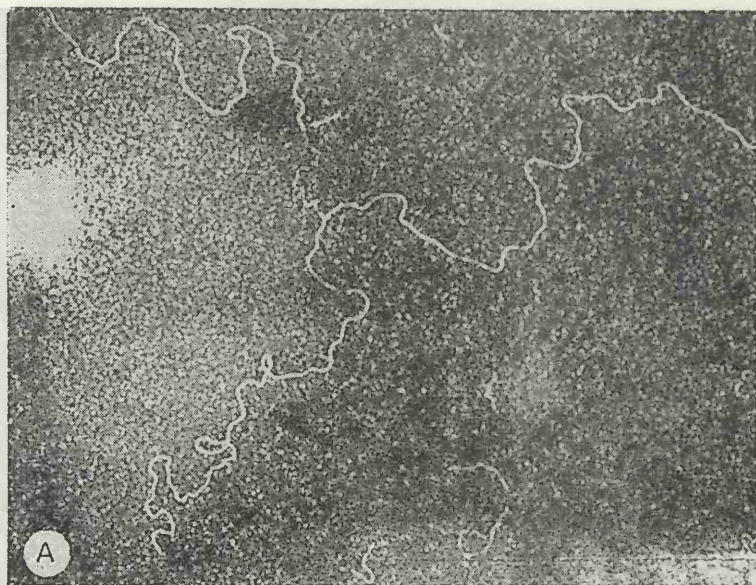
Pl. 16 — A. Microelectronografia unui transpozon evidențiind structura caracteristică, „trunchi și buclă” („stem and loop”) (după Oohen, 1979). B. Microelectronografia ADN extras din fagul Mu (după Delius și Heidelberg, 1978).



Pl. 17 -- Replicarea ADN. A. Genom de fag T7 în care sinteza a fost inițiată la nivelul unui situs „origine” intern, situat la 17% de capătul stâng al moleculei lineare. Intermediarul de replicare conține o regiune internă de duplicare (în formă de „ochi”) a cărei mărime crește în cursul replicării bidirecționale. B. Înaintarea punctului de replicare convertește forma de „ochi” într-un intermediar în formă de Y (microelectronografie după Wolfson și Dressler, 1975).

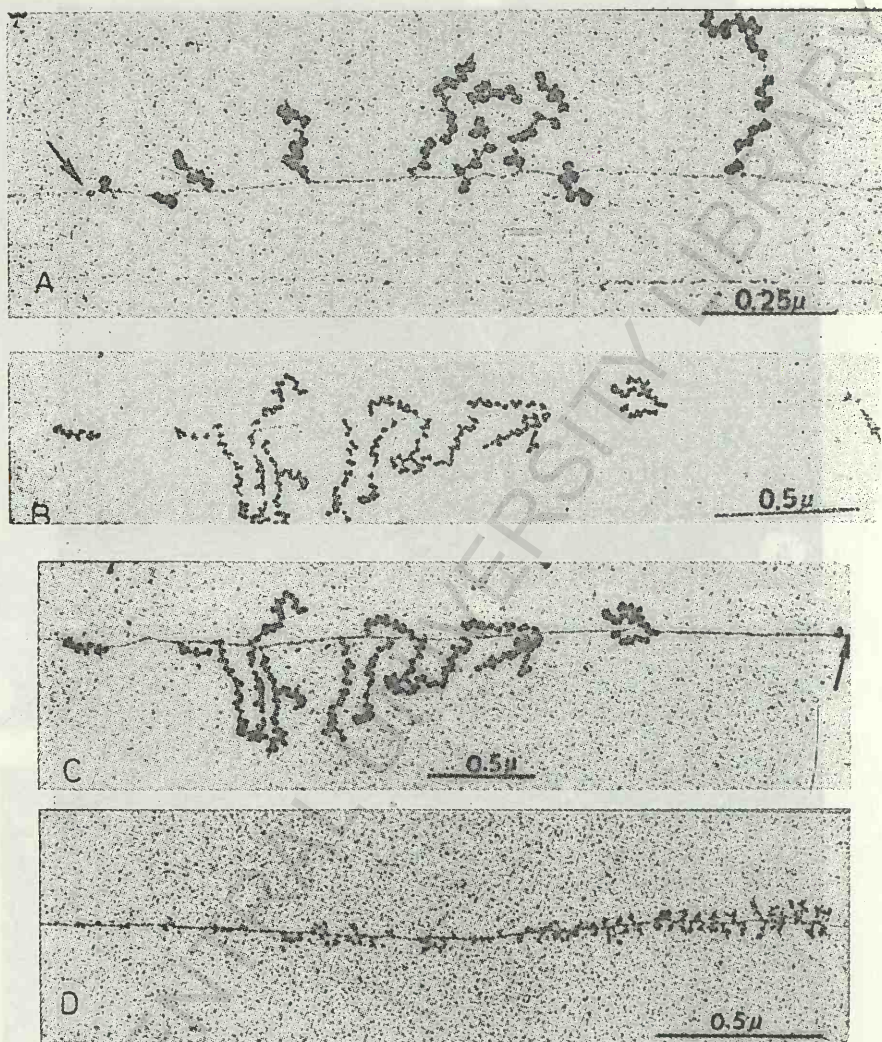


Pl. 18 — A. Moleculă de ADN de fag lambda în curs de replicare, prezentind configurația descrisă de Cairns. Săgețile marchează punctele de creștere ale ADN (microelectronografie după Sims, din Dressler, 1975). Evidențierea punctului de creștere a ADN (microscopie electronică). B. Imaginea unui cromosom de fag T7 în curs de replicare, cu aspectul unui intermediar în formă de Y. C. Genom de fag T7 în curs de replicare, prezentind o regiune matriță monocatenară de o parte a punctului de creștere. Regiunea monocatenară are o lungime de aproximativ 3000 de baze și apare mai subțire și mai puțin rigidă decât ADN dublu catenar (după Wolfson și Dressler, 1975).

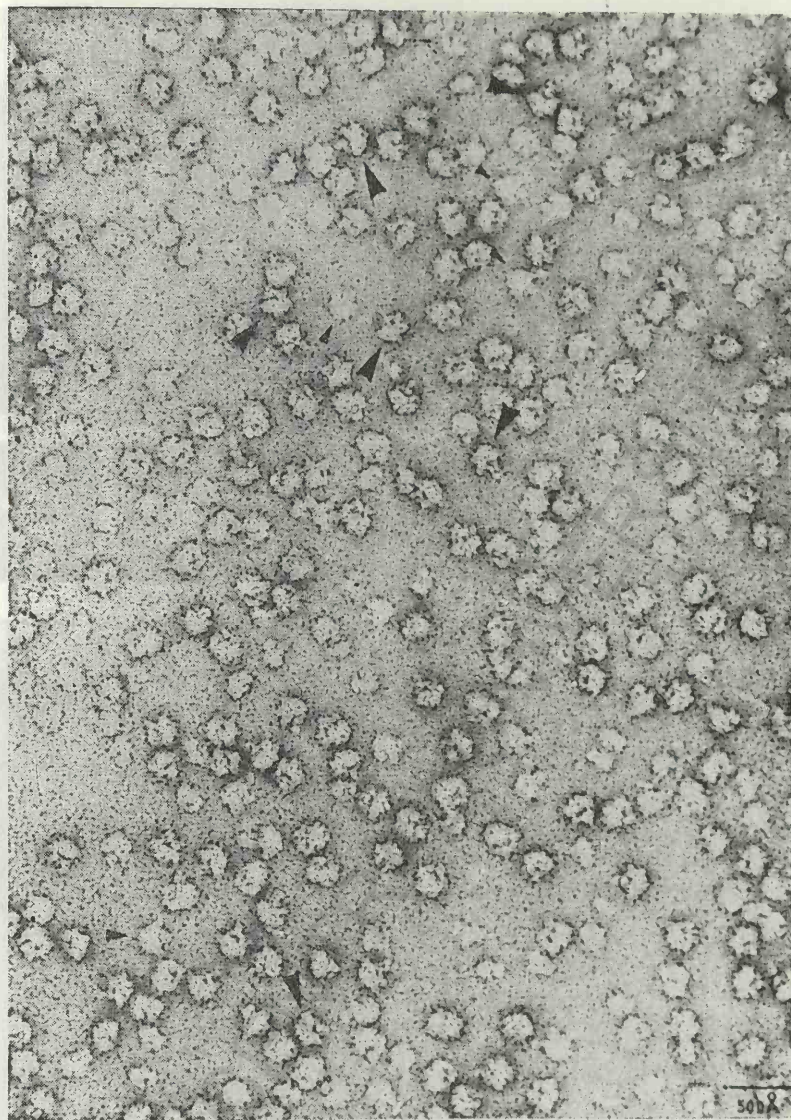


[Pl. 19 — **A.** Microelectronografia moleculelor de ADN T7 in curs de replicare. Imaginea unui genom fagic replicat în proporție de 58%. Extremitatea stângă a moleculei a fost integral replicată și bifurcația de replicare înaintază spre extremitatea dreaptă. Pe una din dubbele helixuri ale acestei forme în „Y” a început un al doilea ciclu de replicare, evident ca o buclă sau formă de „ochi” (→) (după Wolfson și Dressler, 1975).

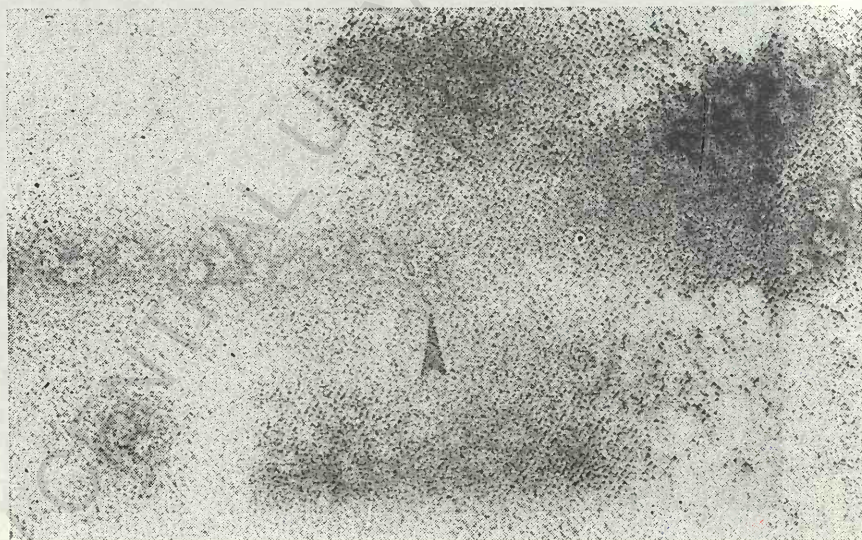
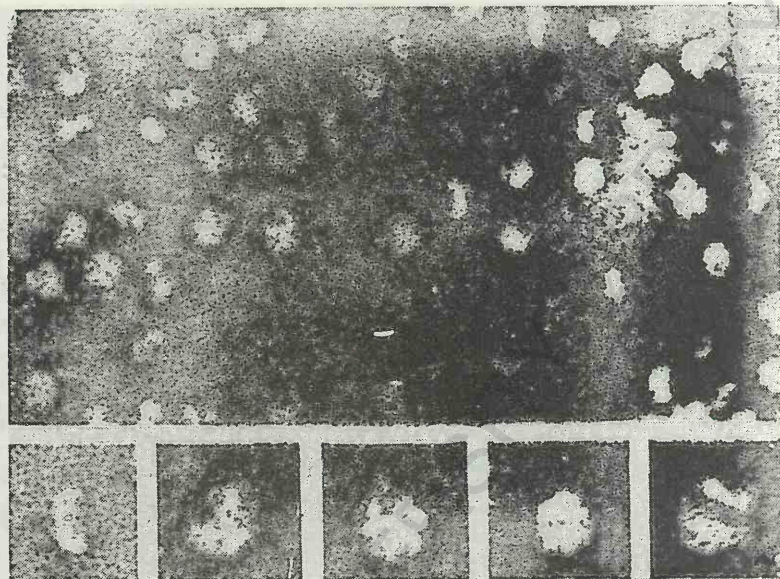
B. Transcrierea genetică. Moleculele de ADN polimerază legate de extremitatea 3' a ADN apar sub forma unor structuri sferice, dispuse regulat de-a lungul acestuia. Molecula de ADN apare ca un filament fin, care unește moleculele de ADN polimerază (după Kornberg, 1980).



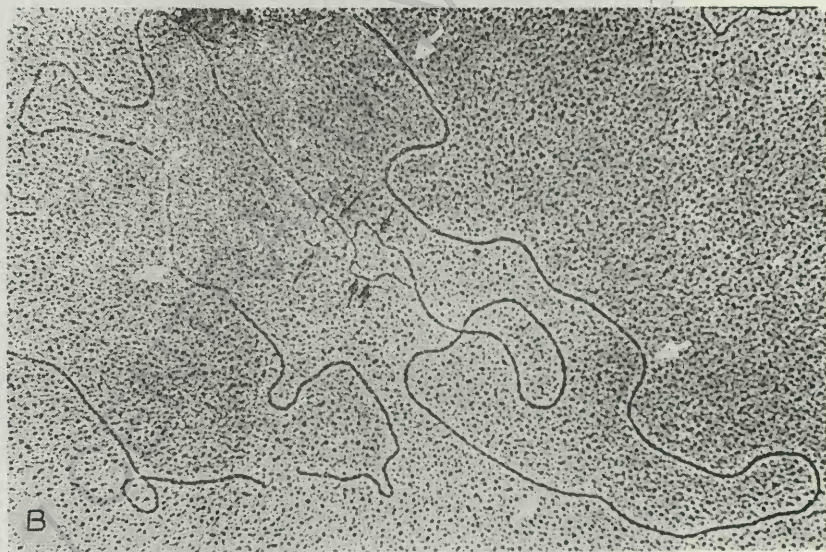
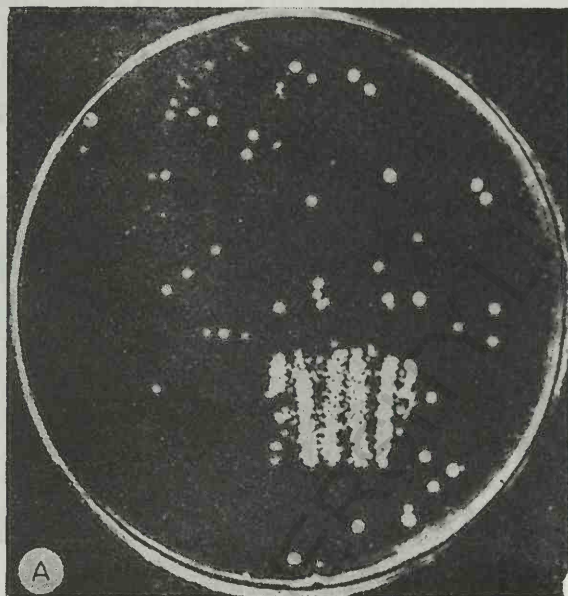
Pl. 20 — A—C. Segmente genetice active din cromosomul *E. coli*, cu poliribosomi atașați. Săgețile indică molecule de ARN polimerază situate în sau lângă situsul de inițiere al transcrierii genetice. D. Porțiune din cromosomul *E. coli* conținând, probabil, cistronii pentru ARNr 16S și 23S în acțiune (după Miller Jr. și Hamkalo, 1972).



Pl. 21 — Ribosomi de *E. coli*. Microelectronografia ribosomilor 70S și a subunităților 50S și 30S (după Lake, 1976).

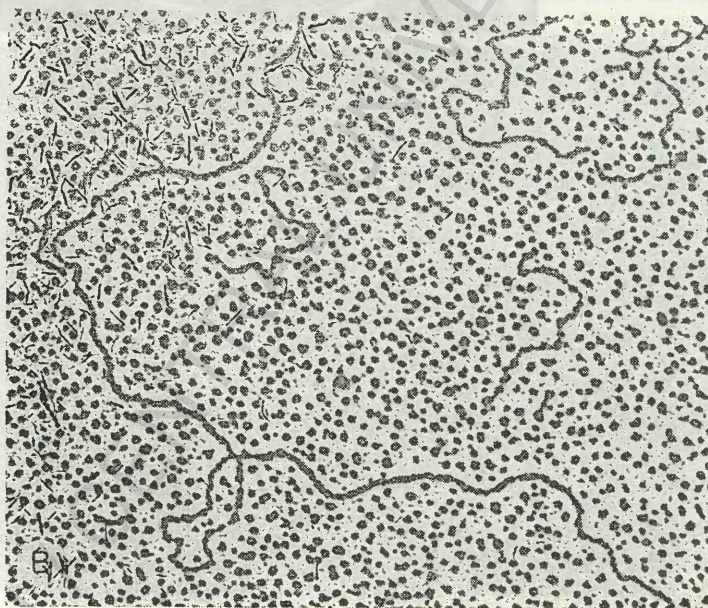
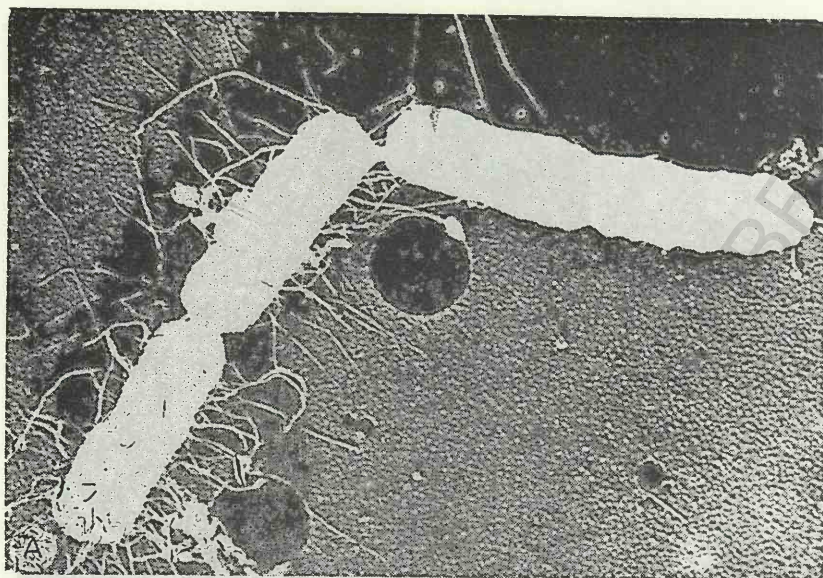


Pl. 22 — Ribosomi de *Escherichia coli*. Sus: ribosomi 70S; mijloc: subunitatea 30S (stînga) urmată de trei subunități 50S și un ribosom 70S reconstituit (după Nomura, 1970). Jos: porțiune din genomul *E.coli* colorat negativ cu acetat de uranil, evidențiind poliribosomii atașați de cromosom, prin molecule de ARN polimerază (săgeata) (după Miller Jr. și Hamkalo, 1972).



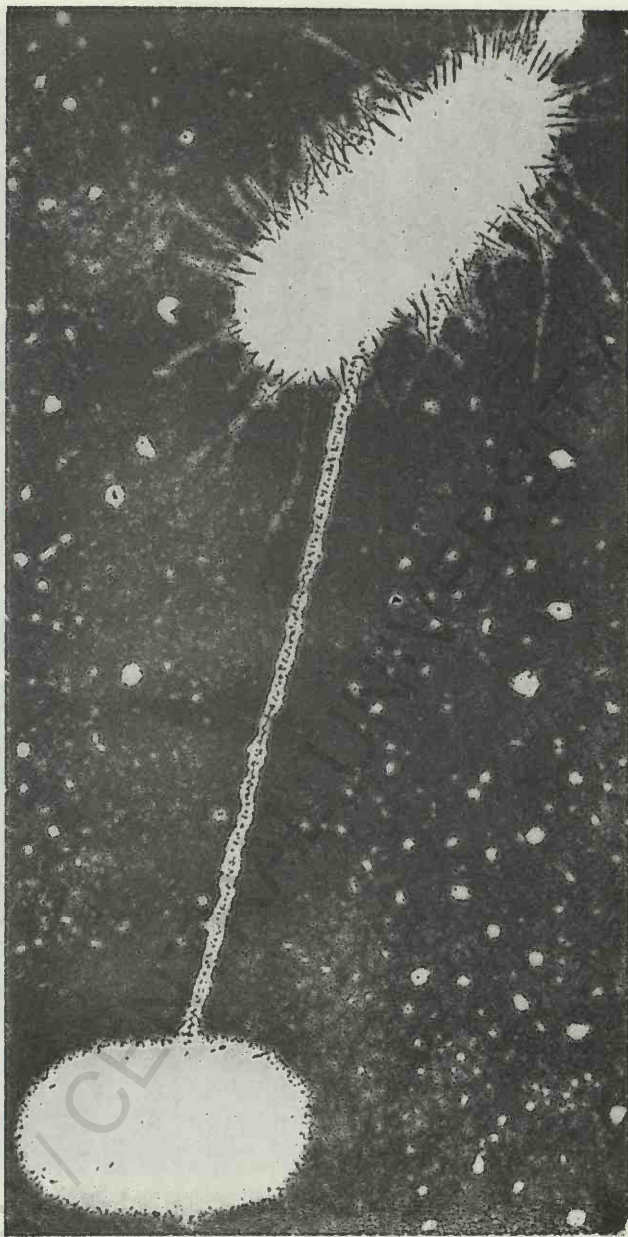
Pl. 23 — A. Fotoreactivarea. După însămînțare abundentă cu *E. coli*, suprafața unei plăci cu agar este expusă la o doză letală de radiații UV și, ulterior, iluminată, pentru scurt timp, cu lumină vizibilă, focalizînd pe suprafața sa imaginea filamentului unei lămpi cu tungsten. După incubare la întuneric se dezvoltă numai cîteva colonii de la celulele supraviețuitoare. În regiunea luminată cu lumină vizibilă, creșterea este abundentă și are forma filamentului de tungsten utilizat pentru fotoreactivare (din Stanier, 1976).

B. Demonstrarea prezenței genelor bacteriene în genomul fagilor transductorii. Imaginea prezintă un heteroduplex lung de 43 000 nucleotide format *in vitro* între ADN al fagului transductor Φ 80 *psu3* și ADN fagic parental, Φ 80. Săgețile unice marchează un segment unic de 3 000 de nucleotide provenit din cromosomul *E. coli*, situat în fața unui segment de ADN viral (două săgeți) de 2 000 de nucleotide, care este prezent la fagul Φ 80, dar este înlocuit de genele bacteriene în genomul fagului transductor. Cele două secvențe de ADN, bacterian și viral, situate pe catene opuse, nu sînt complementare și nu pot forma perechi. Ele apar ca o buclă de substituție. Restul moleculei este dublu catenară (săgeți albe) (după Wu și Davidson, 1981).

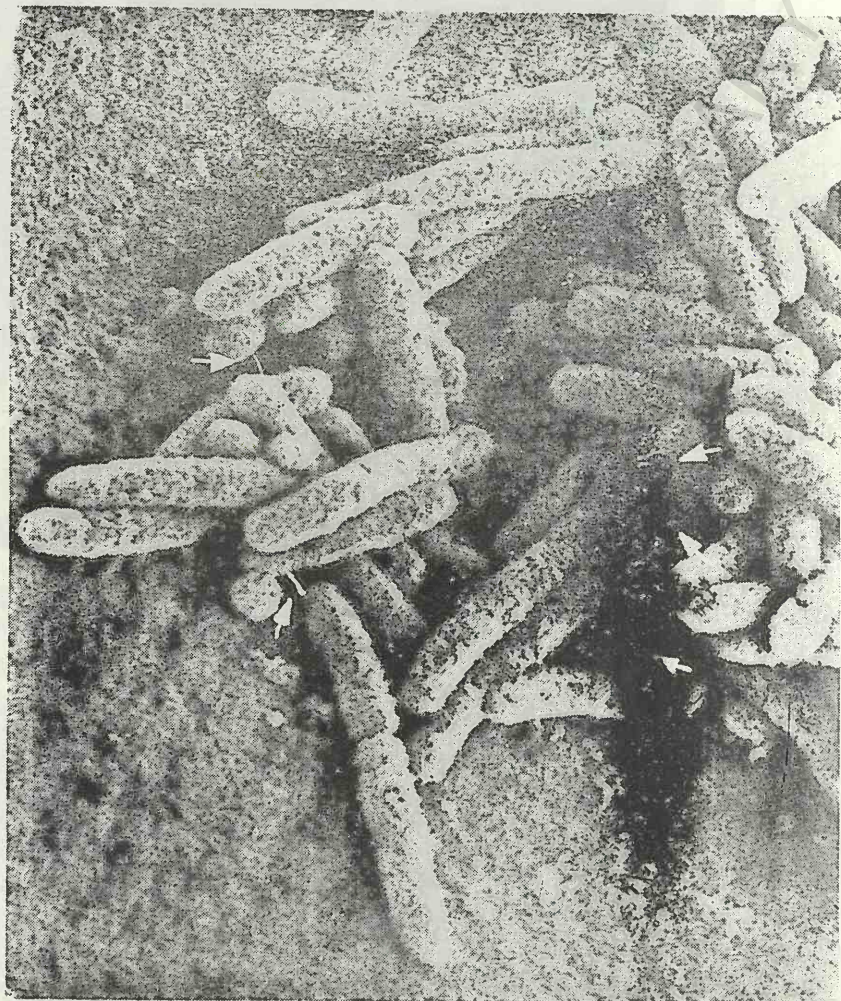


Pl. 24 — A. Celule de *Escherichia coli* K 12 în curs de conjugare. Cu puțin înainte de a fi puse în contact, celulele Hfr (dreapta) au fost marcate prin adsorbția unor fagi inactivi. Cele două celule F⁻ (stinga) sunt înconjurate de simbrii (microelectronografie, după Jacob și Anderson, 1957).

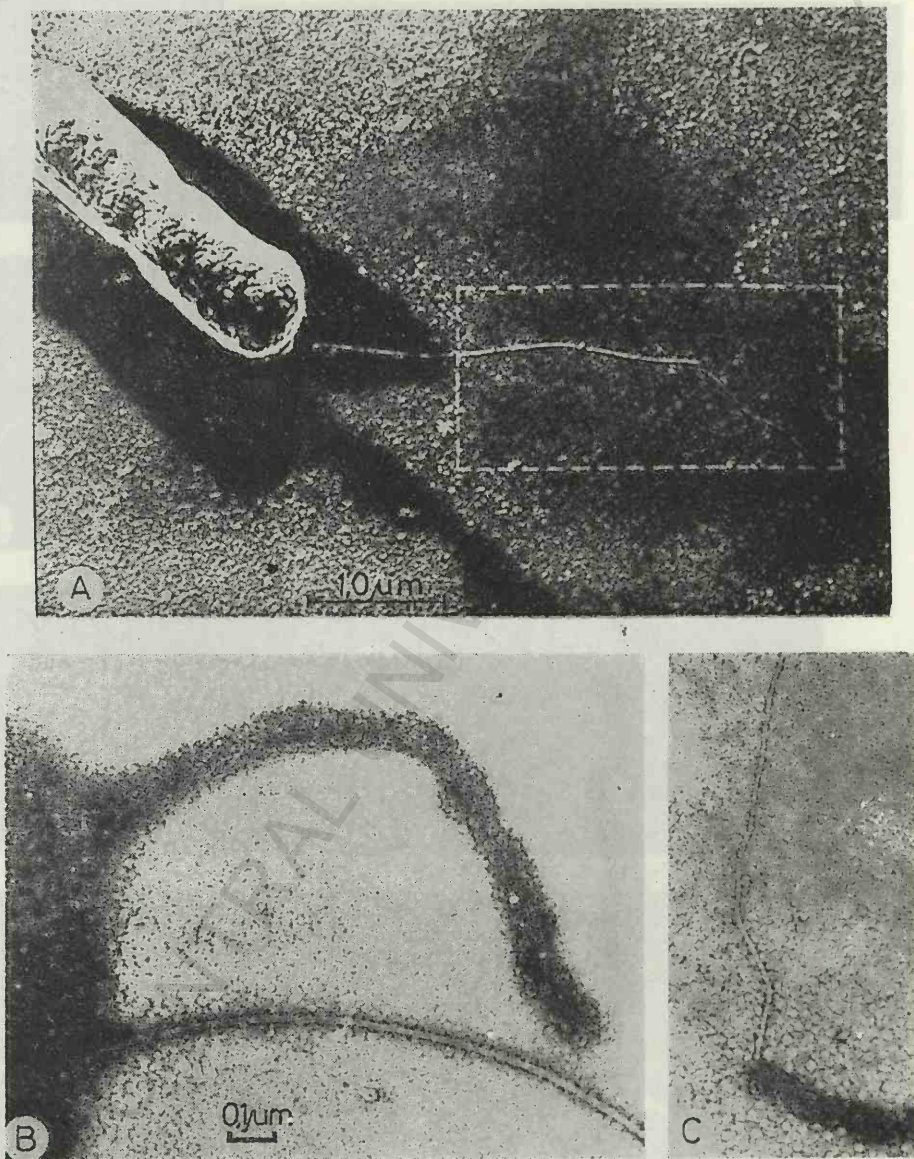
B. Microelectronografia unei molecule heteroduplex între o catenă normală de ADN și o a doua catenă care a suferit două mutații. Bucla de ADN m.c. (stinga jos) rezultă dintr-o deleție care a îndepărtat un segment întreg dintr-o catenă de ADN. Bucla turtită („collapsed bubble”) de ADN m.c. (stinga sus) rezultă din substituirea mai multor nucleotide dintr-o catenă, prin altele, care fac cele două catene necomplementare în regiunea respectivă și, deci, incapabile să formeze ADN d.c. ca în restul moleculei (după Campbell, 1976).



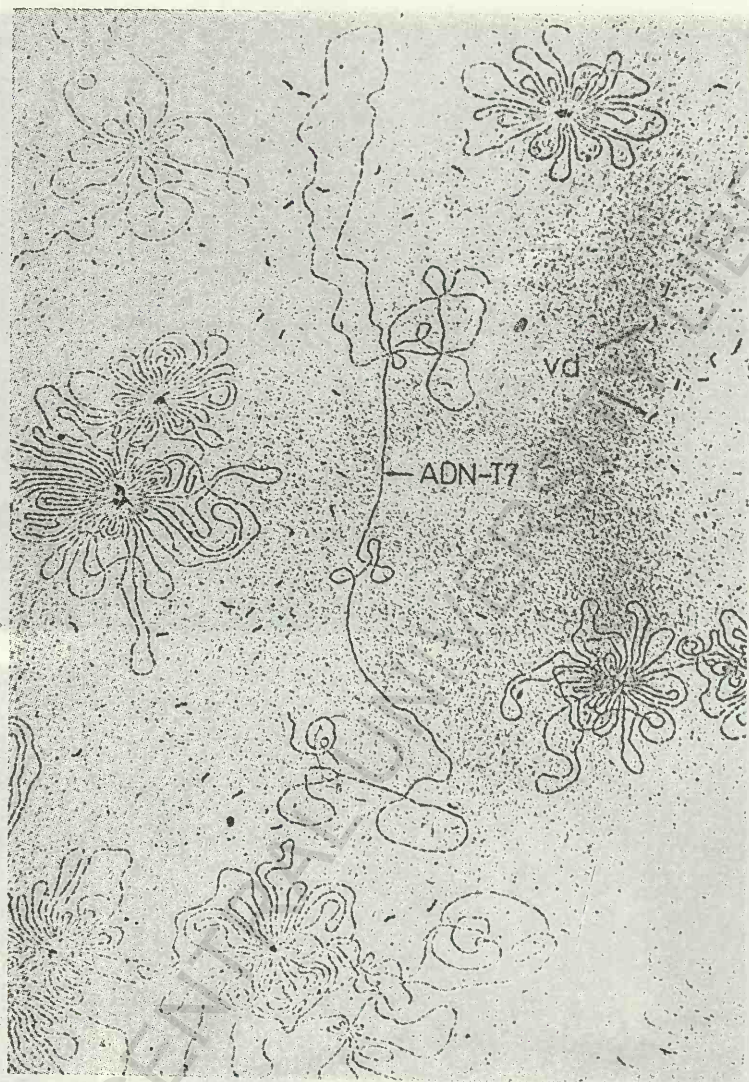
Pl. 25 — Celule de *E. coli* legate prin intermediul unui pil de sex în cursul procesului de conjugare (după Brinton, 1965).



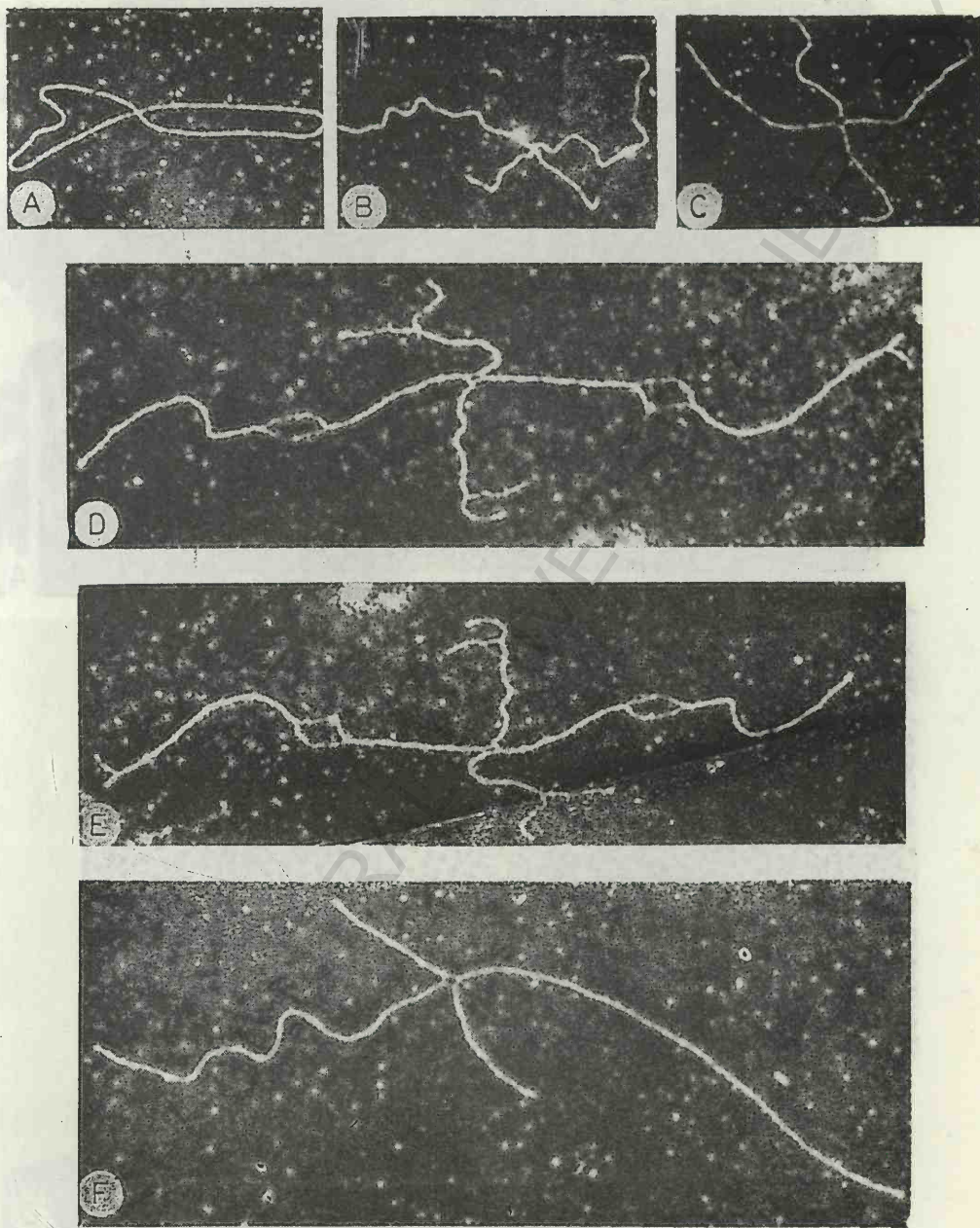
Pl. 26 — Agregat de celule de *E. coli*, format din celule surprinse în momentul diviziunii și pe cale de conjugare (celule legate printr-o conexiune filamentoasă de tipul celor descrise în cazul pililor de conjugare) (microelectronografie în scanning) (după Schaf, 1979).



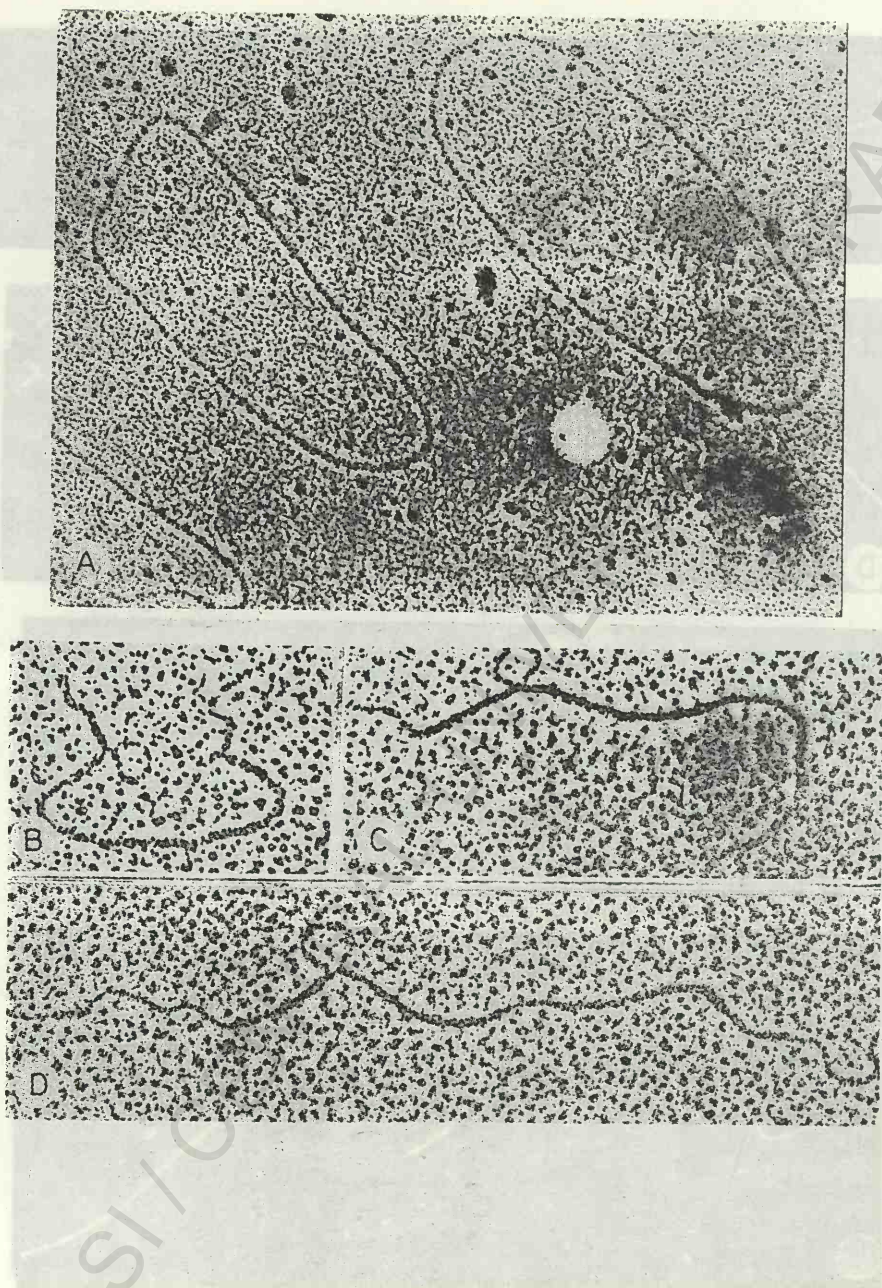
Pl. 27 — A. Pil de sex de la *E. coli*, marcat prin adsorbția unui fag filamentos M13, fixat la extremitatea sa liberă (după Griffith, din Kornberg, 1980). B. Evidențierea unui pil de sex prin adsorbția de fagi ARN MS2, pe suprafața sa. În regiunea inferioară se observă un flagel (după Brinton, 1963). C. Pil de sex marcat cu fagul MS2 pe suprafața sa, având adsorbit la extremitatea liberă fagul filamentos M13 (după Meynell și colab., 1968).



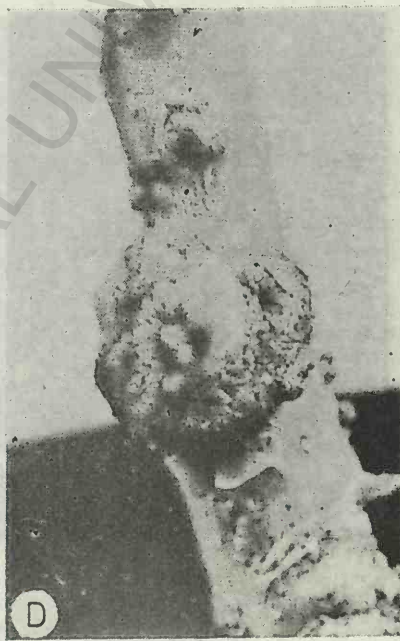
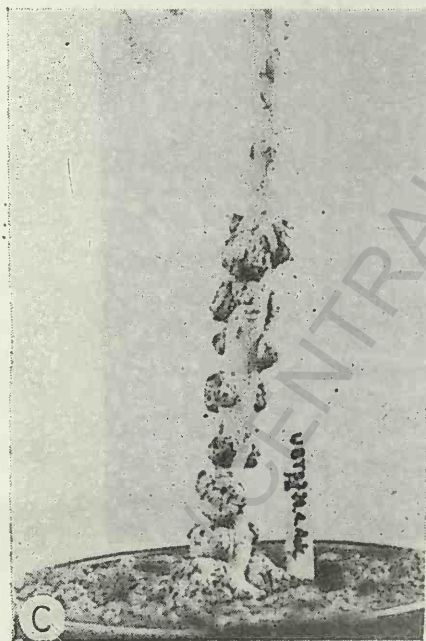
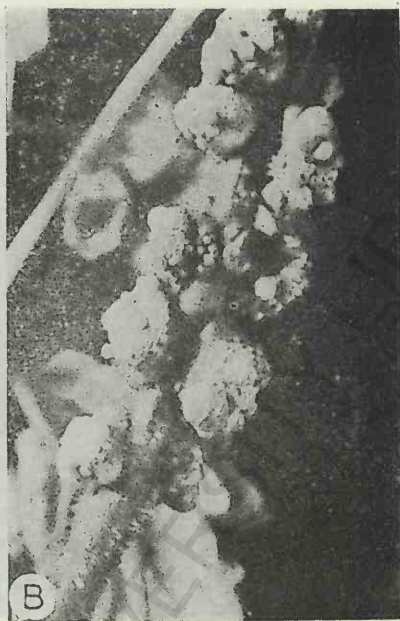
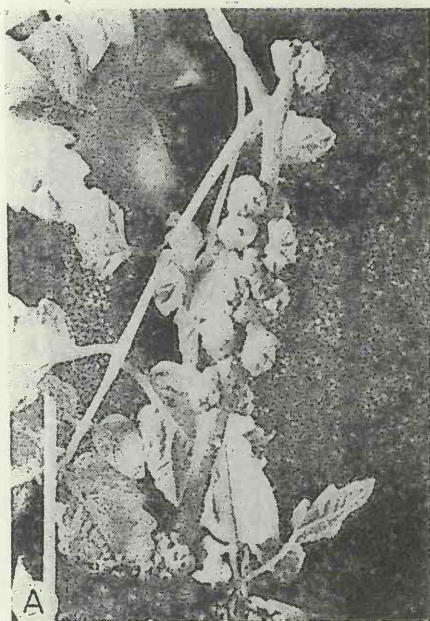
Pl. 28 — Genomul fagului T7 (ADN d.c.) într-un preparat asociat cu ARN viroidal (vd) (după Koler și Sogo, 1973).



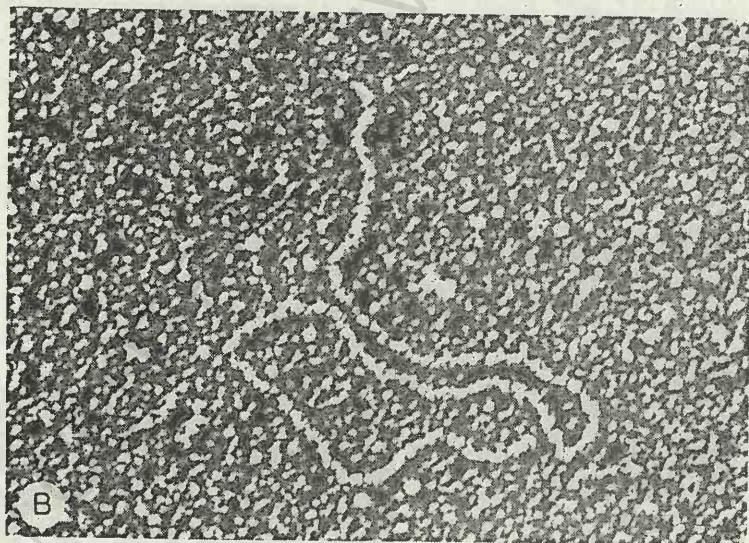
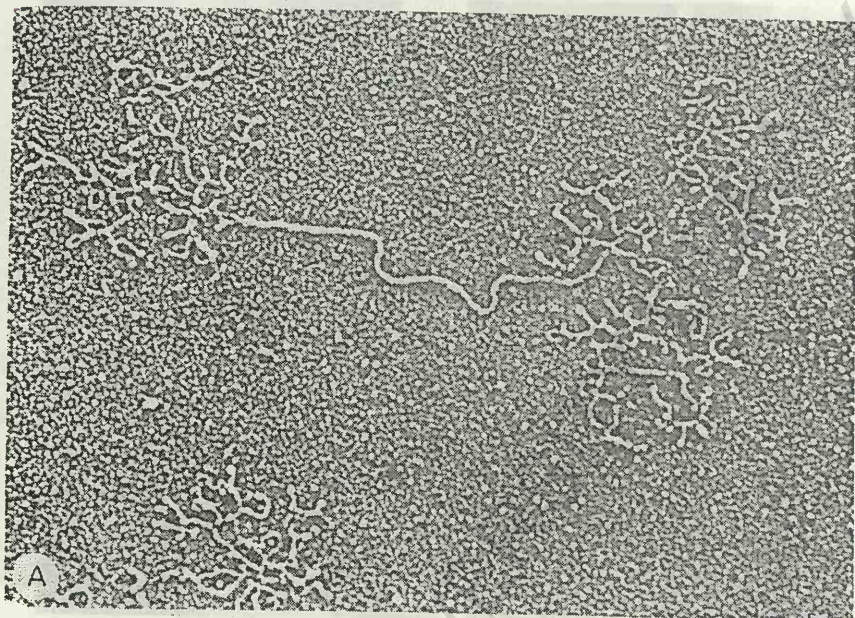
Pl. 29 — Recombinarea genetică. A. Plasmide cu forma cifrei opt (A) și în forma literel *chi* (A și C), în care se văd conexiunile monocatenare în regiunea de crossingover. D. F. Molecule de ADN pe cale de recombinare (intermediari *chi*), prezentînd regiunile de crossingover cu conexiuni monocatenare (după Dressler și Potter, 1982).



Pl. 30 — A. Microelectronografia a două genomuri de fag $\Phi X174$, fiecare avînd lungimea de 1 800 nm (după Griffith și Staehlin, 1977). B—D. Molecule heteroduplex de ADN-ARNm, evidențiînd prezența unor introni lungi de 430 ± 60 pb, într-un segment exonic de $1\,920 \pm 320$ pb din genomul *Adenovirus* tip 2 (după Westphal și Lai, 1977).



PL. 31 — Aspectul tumorilor de tip „crown gall” produse de *Agrobacterium tumefaciens* la tomate (A, B) și la tutun (C, D) (după Ackermann și Heidelberg, 1974).



Pl. 32 — Izolarea genelor *lac*. A. Imaginea unei molecule heteroduplex formată prin recombinarea a două catene „grele” (H). Regiunea centrală d.c. corespunde operonului *lac*. Extremitățile m.c. lipsite de omologie au un aspect ramificat, după tratarea cu o soluție salină 0,2 M. B. Imaginea microelectronografică a operonului *lac* (lungime 1,4 μ m) izolat. Extremitățile m.c. au fost îndepărtate prin acțiunea nucleazei (după Beckwith, 1970).

între ARNr 16 S și secvența Shine-Delgarno ar facilita formarea complexului de inițiere alcătuit din subunitatea ribosomală 30 S f-Met-ARNt^{Met} inițiator și ARNm (Nomura și Cowday, 1967). Rolul secvenței Shine-Delgarno la procariote este evident. Nu se știe încă dacă o astfel de secvență acționează sistematic și la eucariote.

Datorită prezenței grupării formil- și a mărimii sale, singura poziție în care poate fi plasat f-Met-ARNt^{Met} este situsul ribosomal P, de care nu se poate lega nici ARNt^{Met} și nici un alt AA-ARNt liber. Din aceleași motive, f-Met-ARNt^{Met} nu se mai poate lega de complexul ARNm — ribosom după ce sinteza proteinelor a început. Formarea complexului de inițiere 70 S este desăvârșită după aditia subunității 50 S,

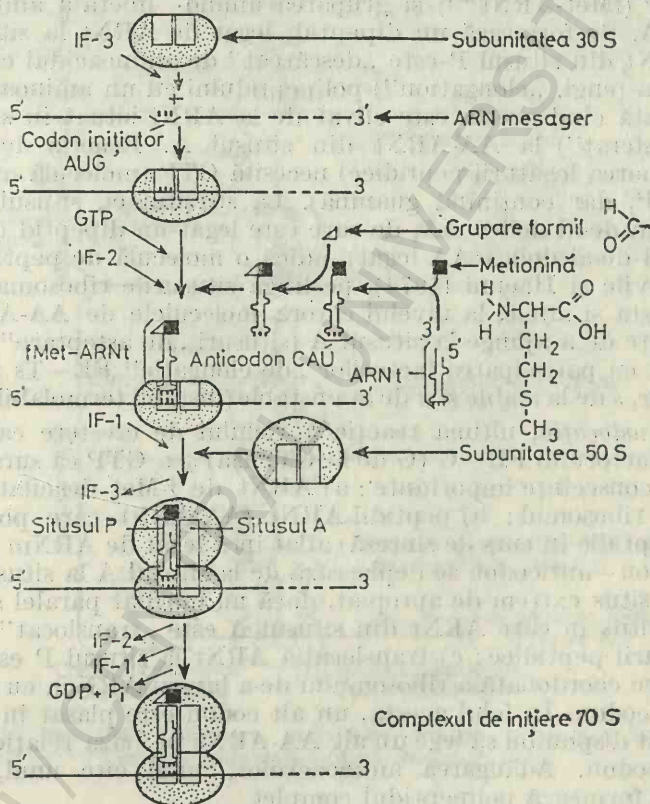


Fig. 165. — Formarea complexului de inițiere a sintezei catenei polipeptidice (după Berkaloff, 1981).

când ARNm este gata să lege al doilea AA-ARNt, specificat de codonul următor de pe ARNm. La sfârșitul acestei faze, GTP este hidrolizat la GDP și Pi, iar cei trei factori IF sint disociați, pentru a fi refolosiți în ciclul următor (fig. 165).

Creșterea lanțului polipeptidic. Aditia fiecărui aminoacid suplimentar are loc printr-o serie de reacții relativ complexe, care se repetă de

atâtea ori, eiți aminoacizi sint în lanțul polipeptidic. Legarea fiecărui aminoacid într-o ordine determinată de natura codonilor dispuși secvențial în ARNm se realizează în trei faze succesive :

1) *Legarea aminoacil-ARNt*. După ocuparea situsului ribosomal P de către f-Met-ARNt inițiator, al doilea complex AA~ARNt (ca și toate celelalte care îi urmează) se leagă la nivelul situsului acceptor A („Aminoacil attachement”), în care are loc interacțiunea dintre codonul ce specifică aminoacidul următor și anticodonul din structura ARNt.

2) *Formarea legăturii peptidice*. Enzima peptidil transferaza, parte integrantă din structura subunității 50 S, catalizează formarea unei legături peptidice între gruparea carboxil a aminoacidului legat de ARNt din situsul P (fMet-ARNt^{Met}) și gruparea amino- liberă a aminoacidului din situsul A. Se formează un dipeptid, legat de ARNt la situsul A, în timp ce ARNt din situsul P este „descărcat” de aminoacidul corespunzător. Creșterea (engl. „elongation”) polipeptidului cu un aminoacid are loc de fiecare dată când acesta este elivat de la ARNt situat în situsul P și legat („transferat”) la AA-ARNt din situsul A. Reacția de elivare — reunire (formarea legăturii peptidice) necesită GTP (moleculă macroergică similară ATP, dar conținând guanină). La sfârșitul ei, situsul A poartă ARNt al celui de-al doilea AA, de care este legat un dipeptid (formil-metionina și cel de-al doilea AA legat), adică o moleculă de peptidil ARNt. După Chapeville și Haenni (1974), pe lângă situsurile ribosomale A și P, ar putea exista și altele, la nivelul cărora moleculele de AA-ARNt ar fi depuse înainte de a ajunge la situsul A (situri „de așteptare”). Procesul este efectuat cu participarea factorilor „de elongație” EF—Ts și EF—Tu (T de transfer, s de la stable și u de la unstable (instabil termolabil) (fig. 166).

3) *Translocația*, ultima reacție a ciclului de creștere care are loc în prezența factorului EF—G (G de la GTPază) și a GTP ca sursă de energie, are trei consecințe importante : a) ARNt de f-Met deacilat părăsește situsul P și ribosomul ; b) peptidil-ARNt (AA-ARNt care poartă legat lanțul polipeptidic în curs de sinteză) aflat încă legat de ARNm prin interacțiunea codon—anticodon se deplasează de la situsul A la situsul P (peptidil). Acest situs extrem de apropiat, dacă nu imediat paralel situsului A servește ca situs în care ARNt din situsul A este „translocat” după formarea legăturii peptidice ; c) translocația ARNt la situsul P este însoțită de o deplasare coordonată a ribosomului de-a lungul ARNm, cu o distanță egală cu un codon. În felul acesta, un alt codon este plasat în situsul A, care a devenit disponibil să lege un alt AA-ARNt pe baza relației specifice codon—anticodon. Adăugarea aminoacizilor, unul câte unul, continuă pînă cînd se formează polipeptidul complet.

Terminarea sintezei

Implică stoparea procesului de creștere a polipeptidului, eliberarea lui de ARNt de care este legat, disocierea subunităților ribosomului și desprinderea lor de ARNm. Ea are loc datorită unui mecanism perfecționat, care intervine, normal, numai după legarea ultimului aminoacid.

Semnalul „stop” este reprezentat de apariția în situsul ribosomal A, în cursul translocației, a unuia din codonii „nonsens” („terminatori”) : UAG (amber). UAA (ochre) sau UGA (opal). La *E. coli*, codonii UAG și UAA sint utilizați ca semnale stop în 100% din cazuri, în timp ce codo-

nul UGA are o eficiență de numai 98% (în 2% din cazuri este „citit” ca un codon sens și traducerea este continuată dincolo de el). Codonii „stop” sînt recunoscuți de factorii proteici de terminare a lanțului FR (engl. releasing factor), care stimulează eliberarea polipeptidelor de la ribosomi.

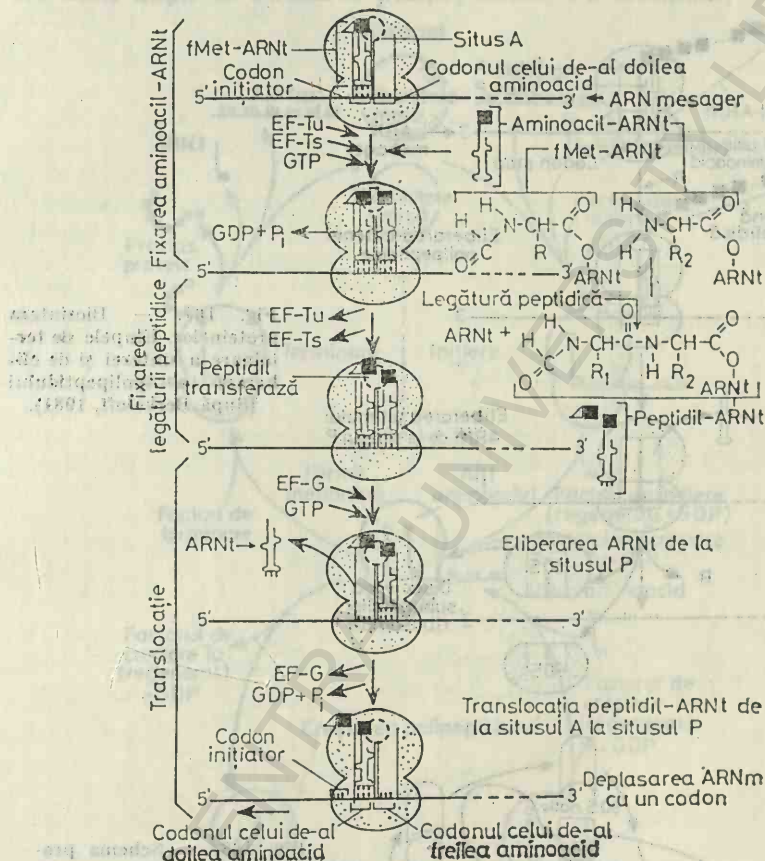


Fig. 166. — Biosinteza proteinelor. Etapele de creștere a catenei polipeptidice (după Berkaloﬀ, 1981).

Factorul FR1 „recunoaște” codonii UAG și UAA, factorul FR2, codonii UAA și UGA, iar factorul FR3 ajută interacțiunea ribosomilor cu primii doi. Fiecare factor este prezent în număr de 500–700 molecule /celulă la *E. coli*.

Stoparea sintezei proteinelor poate fi produsă prin mecanisme moleculare foarte diferite de unele antibiotice cum sînt cloramfenicolul, eritromicina, puromicina etc. Terminarea sintezei implică legarea factorilor terminatori de ribosomi, deplasarea peptidil-ARNt din situsul A în situsul P și formarea la nivelul situsului A a unui complex care include FR1 sau FR2 și un codon stop.

În etapa următoare are loc hidroliza enzimatică a legăturii ester dintre gruparea carboxil a aminoacidului terminal din lanțul polipeptidic format și ultimul ARNt. Această reacție este determinată de acțiunea peptidiltransferazei, a cărei specificitate și acțiune este modificată prin

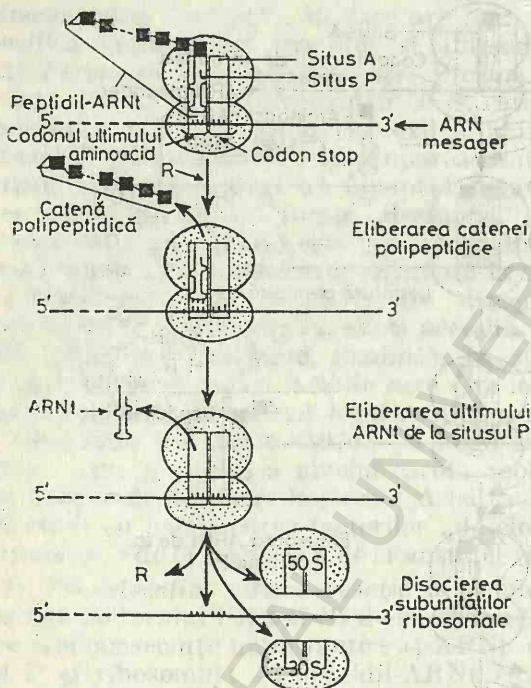


Fig. 167. — Biosinteza proteinelor. Etapele de terminare a sintezei și de eliberare a polipeptidului (după Berkaloft, 1981).

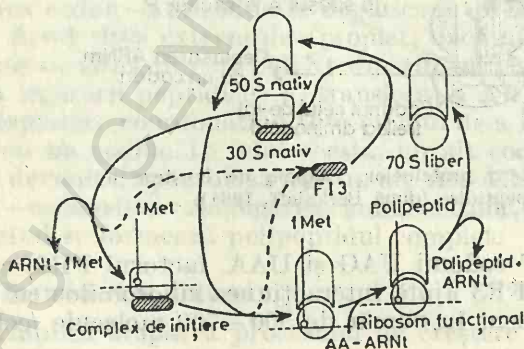


Fig. 168. — Schema procesului de reciclare a ribosomilor în cursul sintezei proteinelor.

legarea factorilor de terminare și/sau de posibilitatea factorului FR3 de a acționa enzimatic în același sens (fig. 167). Ribosomii 70 S se disociază în subunitățile componente cu ajutorul factorului FI 3 (factor de disociere, Bade, 1969) (fig. 168). Lanțul polipeptidic sintetizat suferă ulterior o serie de modificări pentru a da naștere formei sale biologice active. Deoarece este

legat de ribosomi numai la capătul care crește, el se poate plia, luând în parte o configurație tridimensională, înainte ca sinteza să fie terminată. Uneori, chiar după ce inițierea s-a produs, o deformilază îndepărtează gruparea formil, astfel că majoritatea proteinelor ($\sim 45\%$) încep cu metionina. În alte cazuri, o metioninaminopeptidază îndepărtează și metionina N-terminală, după ce formarea polipeptidului s-a terminat, astfel că la

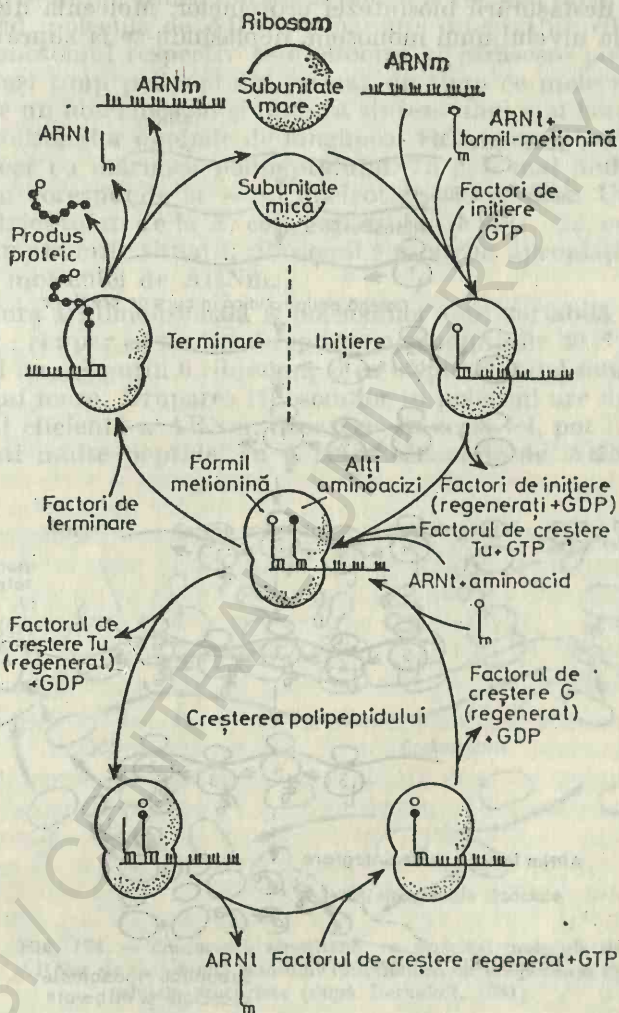


Fig. 169. — Reprezentarea sintetică de ansamblu a fazelor procesului de traducere a informației genetice, în cursul biosintezei proteinelor la bacterii.

E. coli 30% din proteinele totale au la extremitatea terminală alanina, 15% serina și 10% alți aminoacizi (Waller, 1963).

Fig. 169 prezintă sintetic etapele succesive ale procesului de traducere genetică și funcția biologică a ribosomilor în acest proces.

Rolul polisomilor. Viteza mare de sinteză a proteinelor în anumite celule, greu de corelat cu concentrația foarte mică de ARNm, a fost explicată odată cu evidențierea și izolarea poliribosomilor. Aceștia sînt unități funcționale formate din grupuri de ribosomi care pot fi dispersați în ribosomi individuali (monosomi), prin tratare cu RNază, ceea ce demonstrează legarea lor prin intermediul ARNm. Formarea lor are loc în cursul și pe măsura desfășurării biosintezei proteinelor. Molecula de ARNm inițiază sinteza la nivelul unui monosom, deplasîndu-se la suprafața acestuia

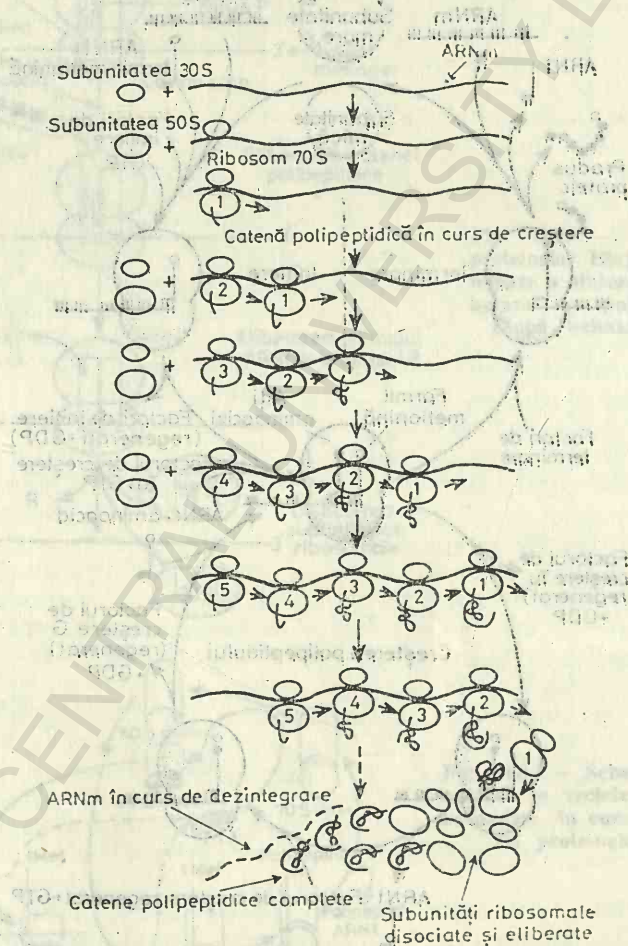


Fig. 170. — Formarea și funcția polisomilor în sinteza proteinelor (după Strickenberg, 1976).

pe măsură ce procesul de sinteză înaintază. Cînd partea ei anterioară a depășit acest monosom, ea se poate angaja pe un al doilea pentru a începe sinteza unui polipeptid identic, după care trece pe un al treilea ș.a.m.d. (fig. 170).

Lungimea polisomului depinde de lungimea ARNm. Datorită acestui mecanism, lungimea lanțurilor polipeptidice fixate pe monosomi succesivi ai unui polisom, variază în funcție de fracțiunea din „banda” de ARNm la care fiecare ribosom a fost deja expus. Această înseamnă că lanțurile polipeptidice sintetizate de-a lungul unei molecule de ARNm sînt mai scurte în porțiunea inițială a benzii și tot mai lungi spre extremitatea ei. Cînd molecula de ARNm a parcurs integral un ribosom al polisomului, monosomul respectiv este eliberat și părăsește polisomul, eliberînd în același timp polipeptidul format, în timp ce molecula de ARNm se fixează pe un nou ribosom și inițiază sinteza unui nou lanț polipeptidic. Lungimea polisomilor depinde de lungimea ARNm, care la rîndul său este corelată direct cu mărimea polipeptidului. În cele mai multe cazuri, fiecare ribosom corespunde la ~ 80 nucleotide ale ARNm. Uneori însă, ca în sistemul trioptofan de la *E. coli*, raportul este de 1 : 22, ceea ce demonstrează că, în anumite situații, ribosomii sînt strîns apropiați unul de altul de-a lungul moleculei de ARNm.

Structura tridimensională a polisomilor este variabilă în funcție de mărimea lor : ei apar ca un tur de spiră, cu subunitățile 30 S orientate spre interior cînd au cel puțin 6 ribosomi, și ca o spirală, cînd numărul acestora este mult mai mare. Gruparea ribosomilor în polisomi are drept urmare o utilizare mai eficientă a ARNm, deoarece, în acest fel, pot fi produse concomitent mai multe peptide, cu o mare economie de ARNm (fig. 171).

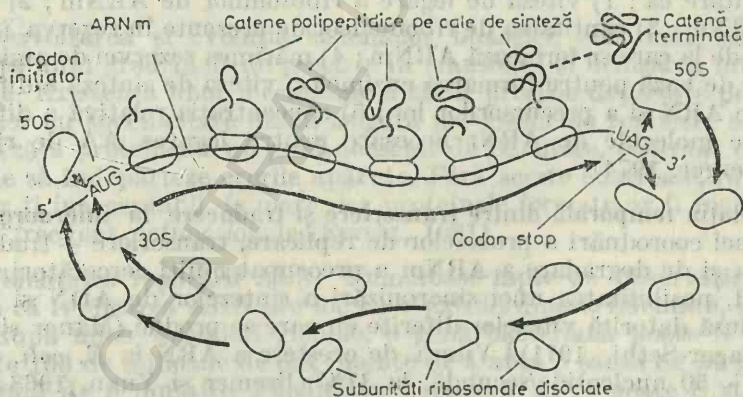


Fig. 171. — Traducerea simultană a aceleiași molecule de ARNm de mai mulți ribosomi funcționînd ca un polisom în celulele procariote (după Berkaloff, 1981).

Polaritatea traducerii genetice. Legarea aminoacizilor în cursul sintezei proteinelor începe cu extremitatea N-terminală și continuă secvențial pînă la capătul C-terminal. Ca urmare, citirea codonilor începe cu tripleta situată la capătul 5' terminal al ARNm și continuă secvențial, pînă la capătul 3', respectiv în aceeași direcție în care are loc sinteza ARNm pe matricea de ADN. Faptul a fost demonstrat de Thach și colab. (1971), care utilizînd un hexanucleotid A—A—A—U—U—U— ca matrice, într-un sistem acelular de sinteză a proteinelor, au obținut un dipeptid cu

secvența lizină—fenilalanină și niciodată fenilalanină—lizină. Viteza sintezei proteinelor este foarte ridicată. La *E. coli*, în perioada de creștere activă, un ciclu complet al procesului durează ~50 milisecunde, ceea ce corespunde unei creșteri cu 20 de aminoacizi pe secundă. În acest fel, un polipeptid de ~150 aminoacizi este sintetizat în ~7 secunde (Rich, 1978, 1981).

Consumul de energie. Biosinteza proteinelor consumă mai multă energie decât oricare alt proces de sinteză celulară. Explicația rezidă în faptul că fiecare fază, de-a lungul întregului proces, are un înalt grad de specificitate, legat de asocierea a doi sau mai mulți componenți. Fiecare treaptă următoare necesită relaxarea celei anterioare, pentru ca un nou, set de asociații, deopotrivă de specifice, să poată apărea (Hunt, 1980) și aceasta de sute de ori înainte ca să fie sintetizată o proteină.

După unii autori, ~50% din energia metabolică produsă de *E. coli* cultivată pe glucoză ar fi investită în sinteza proteinelor. După alți autori, acest consum ar putea să ajungă la 80%. Sinteza unei singure legături peptidice necesită 4 legături macroergice: 2~ de la ATP în procesul de activare a AA, 1~ de la GTP ($GTP \rightarrow GDP + Pi$) pentru legarea fiecărui AA—ARNt de ribosom și 1~ de la GTP pentru translocarea ribosomului pe ARNm, ceea ce corespunde unui consum net de -24,2 kcal.

Reglarea biosintezei proteinelor. În afară de mecanismele de control genetic, biosinteza proteinelor poate fi reglată printr-o serie de mecanisme suplimentare ca: 1) viteza de legare a ribosomilor de ARNm; 2) stabilitatea ARNm; 3) cantitatea de ribonucleotide prezente în rezerva („pool”) celulară de la care se formează ARNm; 4) mărimea rezervei de aminoacizi, material de bază pentru formarea enzimelor, viteza de sinteză a diferitelor tipuri de ARN și a precursorilor lor; 5) concentrația relativă a diferitelor tipuri de molecule de ARNt necesare pentru legarea AA de ribosomi (Strickberger, 1974).

Relația temporală dintre transcriere și traducere la microorganisme. Ideea unei coordonări a proceselor de replicare, transcriere — traducere a ADN, ca și de degradare a ARNm a preocupat mulți cercetători. În primul rând, posibilitatea unei sincronizări a sintezelor de ADN și ARN a fost exclusă datorită vitezelor diferite cu care se produc (Manor și colab., 1969; Sagar-Sethi, 1971).] Viteza de creștere a ARN la *E. coli*, *in vivo*, este de ~50 nucleotide/secundă, la 37°C (Bremer și Yuan, 1968; Baker și Yanofsky, 1968). Viteza de creștere a ADN este de ~1 420 nucleotide/secundă, deci de 28 ori mai mare (Helmstetter și Cooper, 1968). În schimb, creșterea lanțurilor polipeptidice la bacterii se face cu o viteză compatibilă cu sinteza ARN. Astfel, sinteza polipeptidelor *in vivo*, la 37°C, este apreciată de 16 AA/secundă/ribosom la *Salmonella* și de 15 AA/secundă la *E. coli*. Sinteza β-galactozidazei (1 170 AA) durează 80 secunde. Ținând seama de natura tripletă a codonului genetic aceasta corespunde la ~50 nucleotide/secundă din secvența ARNm (Lacroute și Stent, 1968). Aceste date confirmă ipotezele lui Stent (1964), precum și ale lui Byrne și colab. (1964) după care transcrierea și traducerea sînt la bacterii două procese întin coordonate, care se produc evasisimultan și în care viteza traducerii este controlată de viteza transcrierii genetice.

Spre deosebire de microorganismele eucariote, la care — datorită membranei nucleare — traducerea este separată în timp și spațiu de transcriere, la procariote, transcrierea este legată fizic și temporal de traducere. Acest fenomen are o serie de implicații: 1) ARNm poate fi tradus la un capăt al său, în timp ce la celălalt capăt continuă transcrierea; 2) această legătură strinsă este compatibilă cu existența unui ARNm cu viață scurtă, în timp ce separarea este corelată cu prezența unui ARNm stabil; 3) legătura strinsă dintre transcriere și traducere necesită o anumită aranjare a genomului procariot, în sensul că toate genele sale trebuie să fie direct accesibile ribosomilor. Aceasta duce la o limitare a numărului genelor pe care le poate purta o celulă bacteriană. Dacă bacteriile ar avea un număr foarte mare de gene accesibile ribosomilor într-o structură laxă, ar trebui să aibă o mărime foarte mare. Când transcrierea este separată de traducere genele nu trebuie să mai fie direct accesibile ribosomilor și pot fi stocate în configurații compacte, care permit o creștere globală a genomului celular. Apariția mitozei a permis eucariotelor să exploateze capacitatea de a purta genomuri cu g.m. mare, deschizând calea dezvoltării organismelor multicelulare, capabile de diferențiere (Barbieri, 1981).

Fidelitatea proceselor de replicare, transcriere și traducere genetică

Dezvoltarea și evoluția sistemelor biologice este condiționată de existența unui grad înalt de precizie în transferul și utilizarea informației genetice. Existența unor mecanisme a căror precizie depășește pe aceea a enzimelor cu specificitate înaltă asigură proceselor de replicare a ADN și de sinteză a proteinelor un grad deosebit de fidelitate, conectat cu reacții capabile să îndepărteze erorile apărute. Fără aceste controale, rata mutațiilor ar fi inacceptabil de mare, iar proteinele formate ar fi foarte eterogene și frecvent nefuncționale (Fersht, 1981).

Fidelitatea replicării ADN. Numeroase fapte de observație demonstrează că replicarea ADN are loc cu o extraordinară fidelitate, în așa fel încît, după unele aprecieri globale, o genă bacteriană poate fi replicată de peste 100 de milioane de ori, înainte de a avea o șansă de 50% de a fi modificată de o mutație. Fidelitatea replicării ADN poate fi studiată și *in vitro* în sisteme acelulare, prin urmărirea copierii de către ADN polimerază a unui polimer cunoscut (spre exemplu, poli[d(A—T)], în prezența precursorilor proprii, d ATP și d TTP, cărora li se adaugă dGTP și dCTP marcați radioactiv). După Wackernagel (1980), frecvența încorporărilor greșite este de 1 nucleotid la 6 000—12 000 nucleotide corecte, pentru ADN polimeraza α și de 3—4 ori mai fidelă pentru ADN polimeraza β . ADN pol I *E. coli* încorporează greșit odată la 80 000 nucleotide corecte (Agarwal și colab., 1979). Frecvența încorporărilor greșite *in vitro* este în general de câteva ori mai mare decît *in vivo*. Experimentele genetice pe *E. coli* au arătat existența unei frecvențe a greșelilor de replicare corespunzînd la o greșeală la $\sim 10^8$ — 10^{10} nucleotide legate, ceea ce reflectă o fidelitate care depășește pe cea a enzimelor metabolice simple. Utilizînd

un model matematic, Fersht (1981) a comparat frecvența erorilor calculate și a celor observate la *E. coli* în replicarea ADN și în sinteza proteinelor. Din tabelul nr. 27 rezultă că replicarea are loc în medie de 10^5 ori mai corect decât a fost prezis prin modelul respectiv. Această observație pledează pentru ipoteza că erorile făcute în cursul replicării pot fi recunoscute și reparate prin intervenția unor mecanisme specifice.

Tabelul nr. 27

Frecvența erorilor în replicarea ADN și în sinteza proteinelor la *E. coli* (după Fersht, 1981)

Procesul	Frecvența aproximativă a erorilor per monomer legat	
	Calculată	Observată
ADN → ADN	$10^{-4} - 10^{-5}$	$10^{-8} - 10^{-10}$
ADN → ARN	$10^{-1} - 10^{-5}$	10^{-3}
ADN → Proteină	$10^{-1} - 10^{-5}$	$10^{-4} - 10^{-5}$
ARNm ; ARNt	—	$< 10^{-3}$
Selecția amino-acizilor	$< 10^{-1}$	$< 10^{-3}$

Importanța mecanismelor de detectare și corectare a greșelilor („proof-reading and editing mechanisms”) este demonstrată de Hélène (1984). Presupunind că ADN polimeraza ar face greșeli de incorporare (spre exemplu, legarea adeninei în locul citozinei față de guanină pe catena matriță odată la 100 000 de nucleotide încorporate, se poate afirma că procesul evoluează cu o precizie destul de mare, ținând seama de viteza foarte mare a replicării (legarea a $\sim 1\,000$ de nucleotide pe secundă)*. Cu toate acestea, acest grad de precizie este insuficient pentru bacterii al căror genom are 3–4 milioane de nucleotide, deoarece el ar corespunde la $\sim 30 - 40$ nucleotide legate incorect, la fiecare ciclu de replicare. Două activități participă în asociere, pentru a asigura fidelitatea necesară replicării ADN și anume activitatea polimerazică însăși și activitatea exonucleazică $3' \rightarrow 5'$, asociată unor ADN polimeraze procariote.

Activitatea polimerazică. Este evident că ADN polimerazele normale au un rol deosebit de important în selecția corectă a nucleotidelor în cursul replicării, deși mecanismul intim al acestui proces este necunoscut. Dovadă este și faptul că diferitele modificări în structura ADN polimerazei au repercusiuni asupra fidelității de incorporare. Studiile *in vitro* au demonstrat că anumiți fagi T4, caracterizați printr-o frecvență anormală a mutațiilor de-a lungul genomului, codifică o ADN polimerază modificată, care încorporează nucleotide incorecte cu o frecvență de 4–6 ori mai mare decât ADN polimeraza de tip sălbatic. Aceasta demonstrează că ADN polimerazele codificate de fagii mutator sînt defective în funcția de corectare a

* Aceasta ar corespunde practic unei greșeli tipografice (spre exemplu, înlocuirea unei litere), odată la 30 de pagini, conținând fiecare 3 000 de semne.

erorilor de încorporare (proof-reading). În schimb, ADN polimerazele codificate de tulpinile antîmutator au o capacitate de corectare superioară celor de tip sălbatic.

Activitatea exonucleazică $3' \rightarrow 5'$. Considerată inițial ca lipsită de sens, activitatea exonucleolitică $3' \rightarrow 5'$ componentă integrală atât a ADN polimerazei *E. coli*, cît și a ADN polimerazei T4 are o importanță deosebită în replicare, deoarece se manifestă preferențial față de bazele împerecheate incorect. Experimental s-a demonstrat că în cursul replicării ADN, intrarea în acțiune a ADN polimerazei este condiționată de existența unei perechi de baze corecte între nucleotidul terminal al primerului cu nucleotidul opus pe matriță. Dacă această împerechere nu este corectă, adiția nucleotidelor în continuare nu are loc. Activitatea polimerazică este reluată după ce o exonuclează $3' \rightarrow 5'$ a îndepărtat nucleotidul legat greșit și a restabilit perechea de baze corespunzătoare (Johnston, 1979).

După Hélène (1984), acest proces se petrece ca și cum ADN polimeraza ar privi în urma sa „după fiecare etapă de polimerizare, „recitind” informația înscrisă și, înainte de a înainta încă o treaptă pentru a lega nucleotidul următor, o corectează dacă nu este conformă cu originalul”. Uneori însă, ADN polimeraza poate avansa înainte de a avea timpul necesar să recunoască și să corecteze o anumită greșeală. Radman (1980) a descris existența unor sisteme suplimentare „de siguranță”, reprezentate de anumite proteine și enzime asociate, capabile să recunoască și să repare greșelile de replicare produse de ADN polimerază. O altă enzimă ar urma la o distanță mai mare, „balizind” o catenă, prin adiția unor grupări chimice pe anumite baze (spre exemplu gruparea CH_3 pe adenină). În cursul replicării, enzimele care urmează imediat ADN polimeraza, întilnesc o catenă balizată (cea care servește de matriță ADN polimerazei și care este pe cale de a fi copiată) și o catenă care încă nu este marcată (cea pe care ADN polimeraza este în curs să o formeze). Datorită acestei diferențe, enzimele cu funcție reparatoare descrie, recunosc catena care trebuie corectată.

După Watson (1977), nevoia constantă de a corecta greșelile de replicare ar putea fi motivul pentru care nu a evoluat nici o enzimă cu activitate polimerizantă în direcția $3' \rightarrow 5'$. Dacă procesul de creștere a catenei ADN ar avea loc în această direcție, extremitățile care cresc ar fi obligatoriu terminate cu grupări trifosfat, ale căror legături macroergice sînt necesare pentru adiția nucleotidului următor. În acest caz, îndepărtarea unui nucleotid încorporat greșit în cursul corectării greșelii ar crea catene terminate cu gruparea 5'-monofosfat, de la care polimerizarea nu poate continua decît în prezența unei surse de energie.

Acuratețea sintezei proteinelor. Măsurătorile fidelității globale a sintezei proteinelor la *E. coli* au arătat că un aminoacid asemănător (în-rudit) poate înlocui pe cel normal, odată la 3 000 de aminoacizi legați (Lottfield și Vanderjagt, 1972; Edelman și Gallant, 1977). Această cifră include erorile de transcriere ADN \rightarrow ARNm, de legare codon—anticodon pe ribosom și pe cele de selecție a aminoacizilor și a ARNt de către enzima care activează aminoacizii (Fersht, 1981). Frecvența erorilor este și mai mică în cazul aminoacizilor diferiți ca structură, în cazul cărora un aminoacid „rău” este încorporat greșit la 10 000 de legături normale (tabelul nr. 28).

Erorile observate (calculate pe baza frecvenței erorilor măsurabile în ARNm și în proteine sînt mai mici decît una pe catenă și se află deci la granița cu fidelitatea absolută („error-free”). Există și excepții, ca de

Tabelul nr. 28

Numărul total al erorilor în sinteza proteinelor cu g.m. 110 000 dal, 1 000 de resturi codificate de 3 000 de baze (după Fehst, 1981)

Procesul	Numărul total de erori	
	Calculat	Observat*
ADN → ARN	0,03—0,3	10^{-5} — 10^{-7}
ADN → ARNm	0,03—0,3	0,3
Conținut în aminoacizi „răi”	10—100	0,3

* Calculat pe baza frecvenței erorilor observate.

exemplu cele observate de Parker și colab. (1980), care au semnalat acuratețe mai mică de 3—10 ori în sinteza unei proteine fagice. Cu toate diferențele de apreciere cantitativă, toate aceste date pledează pentru existența unor mecanisme variate de corectare la nivelele de replicare a ADN, de transcriere și de traducere genetică (Yarns, 1980). În absența lor, conținutul în aminoacizi al proteinelor ar fi dezastruos de eterogen, conținînd cîteva zeci de aminoacizi „răi”/lanț. De asemenea, frecvența mutațiilor ar fi ~una/generație/proteină. Multiplicate cu numărul total al proteinelor din *E. coli*, aceste date reflectă numărul extrem de mic de bacterii progene eficiente care ar rezulta din multiplicare, deoarece acumularea erorilor în sinteza proteinelor reprezintă o sursă esențială de scădere progresivă a eficienței biologice a celulelor respective (Orgel, 1973).

Deși existența mecanismelor de corectare a erorilor este evidentă, natura lor este încă puțin cunoscută. Este probabil că enzimele-cheie implicate în polimerizările asociate căilor biosintetice ar fi multifuncționale, avînd și o activitate hidrolitică adițională, utilizată pentru a exeiiza intermediarii incorecți pe măsură ce se formează. Aceasta ar permite ca aditia fiecărui monomer să fie controlată de două ori: odată în cursul incorporării și apoi în cursul corectării.

Importanța acestor mecanisme este esențială, deoarece replicarea lipsită de fidelitate duce la sinteza de proteine defecte, iar sinteza inexactă de proteine produce, în primul rînd, ADN și ARN polimeraze, ca și enzime de reparație cu fidelitate scăzută (Holliday și Tarrant, 1972). Este probabil că evoluția mecanismelor de corectare a erorilor a fost paralelă cu evoluția vieții, deoarece complexitatea crescîndă este corelată cu o acuratețe crescîndă, necesară pentru a o menține. În primele etape ale

evoluției au existat, probabil, sisteme de corectare primitive și ineficiente, care au permis o frecvență mare a mutațiilor și au fost chiar necesare pentru a asigura diferitele căi de adaptare la un mediu schimbător. În cursul acestui proces, selecția a favorizat celulele primitive avînd o „mașinărie” de sinteză proteică, care acționau cu o acuratețe mai mare. În acest fel, în natură s-a realizat un echilibru între tendința de replicare cu acuratețe (de păstrare a genei ca o unitate intactă), dar în același timp, cu suficientă imprecizie pentru a permite ca rata mutațiilor spontane să fie suficient de mare pentru a asigura adaptarea la mediul permanent schimbător și la evoluția organismelor respective. Probabil că pe această cale rata mutațiilor a ajuns la nivelul optim, care asigură dezvoltarea normală a bacteriilor (Fersht, 1981).

LA BACTERII

Vorbindu-se este o calitate in-
gustă de natură însăși a răsă-
de așezare programului de acți-
într-o anumită via recepție în in-
terferență

F. IACOB

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITATII

the results of an extensive investigation of the role of the various components of the nucleolus in the synthesis of ribonucleic acids. It is well known that the nucleolus is a site of intense metabolic activity, and it is of interest to know whether or not it is also a site of ribonucleic acid synthesis. The results of the present investigation show that the nucleolus is indeed a site of ribonucleic acid synthesis, and that the synthesis is controlled by the nucleolar proteins. The results also show that the nucleolar proteins are involved in the regulation of the rate of ribonucleic acid synthesis. The results of the present investigation are in agreement with the results of other workers in this field.

Protein	Rate of ribonucleic acid synthesis
ADN	1.0
ARN	1.0
ADN + ARN	1.0
ADN + ARN + protein	1.0
ADN + ARN + protein + nucleolar protein	1.0

ADN = adenosine deaminase
ARN = adenosine ribonucleoside
protein = protein

The results of the present investigation show that the nucleolus is a site of ribonucleic acid synthesis, and that the synthesis is controlled by the nucleolar proteins. The results also show that the nucleolar proteins are involved in the regulation of the rate of ribonucleic acid synthesis. The results of the present investigation are in agreement with the results of other workers in this field. The results of the present investigation show that the nucleolus is a site of ribonucleic acid synthesis, and that the synthesis is controlled by the nucleolar proteins. The results also show that the nucleolar proteins are involved in the regulation of the rate of ribonucleic acid synthesis. The results of the present investigation are in agreement with the results of other workers in this field.

The results of the present investigation show that the nucleolus is a site of ribonucleic acid synthesis, and that the synthesis is controlled by the nucleolar proteins. The results also show that the nucleolar proteins are involved in the regulation of the rate of ribonucleic acid synthesis. The results of the present investigation are in agreement with the results of other workers in this field. The results of the present investigation show that the nucleolus is a site of ribonucleic acid synthesis, and that the synthesis is controlled by the nucleolar proteins. The results also show that the nucleolar proteins are involved in the regulation of the rate of ribonucleic acid synthesis. The results of the present investigation are in agreement with the results of other workers in this field.

The results of the present investigation show that the nucleolus is a site of ribonucleic acid synthesis, and that the synthesis is controlled by the nucleolar proteins. The results also show that the nucleolar proteins are involved in the regulation of the rate of ribonucleic acid synthesis. The results of the present investigation are in agreement with the results of other workers in this field. The results of the present investigation show that the nucleolus is a site of ribonucleic acid synthesis, and that the synthesis is controlled by the nucleolar proteins. The results also show that the nucleolar proteins are involved in the regulation of the rate of ribonucleic acid synthesis. The results of the present investigation are in agreement with the results of other workers in this field.

VARIABILITATE ȘI EVOLUȚIE LA BACTERII

„Variabilitatea este o calitate inseparabilă de natura însăși a viului, de structura programului, de modul în care acesta este recopiat la fiecare generație”.

F. JACOB

VARIABILITATE SI EVOLUTIE LA BACTERII

„Variabilitatea este o calitate necesara
pentru dezvoltarea si adaptarea la mediu
de structura programului de studii
in care acesta este necesar la
curs general”

E. IACOB

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mutațiile și mutageneza

(Pl. 23—24)

„Natura însăși a codului genetic împiedică orice modificare deliberată a programului sub efectul acțiunii sale sau a mediului. Ea interzice orice influență asupra mesajului și a produșilor exprimării sale. Programul nu primește lecțiile experienței ...”

F. JACOB

Mutațiile reprezintă modificări spontane, cu caracter nederajat, care survin brusc în structura unor determinanți genetici și care, afectând o parte din informația genetică a organismului, duc la apariția unui genotip „mutant”, transmisibil ereditar, ce se exprimă printr-un fenotip diferit de cel normal (corespunzător genotipului sălbatic). La nivel molecular, ele reprezintă alterări, în general permanente ale secvenței de baze a acizilor nucleici din genomul unui virus (în cazul ribovirusurilor mutația afectează ARN) sau organism (localizate în cromosom sau plasmide), indiferent dacă au sau nu un efect fenotipic vizibil (Birge, 1981).

Terminologie. *Premutația* este o leziune a ADN, potențial capabilă să producă o mutație. Realizarea acestui potențial depinde de o serie de factori diferiți, ca activitatea sistemelor de reparație genetică și de pareuregera unei căi mutaționale adesea complicată.

Mutația este o modificare stabilă, ereditară, a ADN, rezultând din alterarea configurației unei sau mai multor perechi de baze. Ea poate exista într-o celulă fără să se manifeste printr-un fenotip mutant.

O *mutantă bacteriană* este un organism individual care prezintă un fenotip mutant (în care s-a realizat exprimarea mutației). Necesitatea acestei distincții între termenii menționați este ilustrat în cazul rezistenței la streptomycină indusă prin mutații cu UV: 1) dimerii de pirimidină reprezintă leziunile premutaționale, 2) mutațiile în ADN apar ulterior, prin alterări în secvența bazelor, 3) expresia lor fenotipică este întârziată de un interval care implică diviziunea celulei și sinteza proteinelor ribosomale modificate, precedind producerea finală a mutantelor, care sînt fenotipic rezistente la streptomycină (Clarke și Shankel, 1975).

Mutațiile sînt generate „prelucrate” și exprimate prin intermediul unei *căi mutaționale* complexe (Auerbach, 1970; Clarke, 1972, 1975), care poate lua naștere, teoretic, la mai multe nivele: 1) reacția dintre agentul mutagen și ADN; 2) utilizarea precursorilor modificați de mutagen sau a analogilor bazelor în replicarea și repararea ADN; 3) erori în replicarea ADN; 4) erori în recombinarea ADN; 5) erori în repararea ADN; 6) indirect, prin erori în transcrierea genetică, sau 7) indirect, prin erori în traducerea genetică.

Tipurile de mutații

Clasificarea mutațiilor poate fi făcută după mai multe criterii care nu se exclud reciproc.

După modul lor de apariție

1) *Mutații spontane*, care apar în natură datorită unor cauze, „necunoscute”, în condiții de mediu obișnuite și fără intervenția vreunui factor decelabil.

2) *Mutații induse*, care se produc sub acțiunea unor factori de mediu, funcționând ca agenți mutageni, în sensul că măresc ritmul sau rata de apariție a unor mutații, care oricum s-ar fi produs și spontan, dar la intervale mai mari de timp.

După sensul modificării în raport cu mesajul genetic inițial

1) *Mutații „înainte”* („foreword mutations”), care implică o modificare de la o stare genetică desemnată arbitrar ca „normală” (corespunzătoare tipului sălbatic) la o stare nouă „mutată”.

2) *Mutațiile „înapoi” sau regresive, retromutațiile* („back” sau „reverse mutations”), care afectează o celulă mutantă, determinând revenirea acesteia la tipul sălbatic inițial.

În practică, populațiile bacteriene cultivate vreme îndelungată (de ex. în chemostat) tind să evolueze spre echilibru genetic: proporția celulelor mutante devine constantă pe măsură ce numărul evenimentelor mutaționale „înainte” îl egalează pe cel al mutațiilor „înapoi” (Birge, 1981).

În raport cu exprimarea lor fenotipică

1) *Mutații perceptibile*, manifestându-se prin schimbări de diferite grade ale unor caractere fenotipice.

2) *Mutații imperceptibile*, în cazul în care caracterul genotipic mutant nu se exprimă fenotipic.

3) *Mutații letale*, în care alterarea mesajului genetic are un efect mortal pentru organismul afectat de mutație.

În raport cu mărimea segmentului genetic modificat

1) *Mutațiile punctiforme* („point mutations”) au ca substrat alterarea unui singur nucleotid, respectiv a unui singur codon. Studiul lor a permis definirea unității de mutație — *mutonul* (Benzer, 1962), care corespunde celei mai mici părți din genom, a cărei modificare are drept consecință o mutație punctiformă. Ea corespunde din punct de vedere chimic unui nucleotid, cea mai mică unitate structurală de construcție a materialului genetic, iar din punct de vedere funcțional codonului (cea mai mică unitate de mesaj genetic a cărei semnificație poate fi alterată prin mutație).

Mutațiile punctiforme pot fi produse prin *tranzicție*, *transversie*, *inserție* sau *deleție* (fig. 172). În cazul în care mutația are drept urmare substituția unui aminoacid cu altul cu proprietăți similare, mutația produce

modificări chimice fine în structura și funcția proteinei (mutație „conservatoare”). Prin contrast, mutațiile care produc înlocuirea cu un aminoacid dintr-un grup diferit pot determina modificări mai severe în structura proteinelor. Caracterul „degenerat” al codului genetic permite substituirea unor nucleotide, în anumiți codoni particulari, fără schimbarea aminoacidului specificat. Mutațiile punctiforme sînt recunoscute prin capacitatea lor de a suferi reversii „adevărate” și prin proprietatea lor de a produce recombinanți de tip sălbatic, cu toate tulpinile cu mutații în aceeași genă, cu excepția celor în care același nucleotid a fost înlocuit prin substituire sau eliminat prin deleție.

2) *Mutațiile extinse* („gross mutations”) reprezintă alterări care depășesc limitele unui codon, putînd afecta secvențe mai mari ale unei sau mai multor gene (mutație poligenică).

Modificări biochimice mutaționale în structura ADN

1) *Substituția*, sau înlocuirea unei baze normale cu o altă bază, poate genera două tipuri de erori:

a) *Tranziția*: substituirea unei purine cu altă purină ($A \rightleftharpoons G$) sau a unei baze pirimidinice cu altă pirimidină ($C \rightleftharpoons T$) (fig. 172).

b) *Transversia*: înlocuirea unei baze purinice cu o bază pirimidinică sau a unei purine cu o pirimidină:

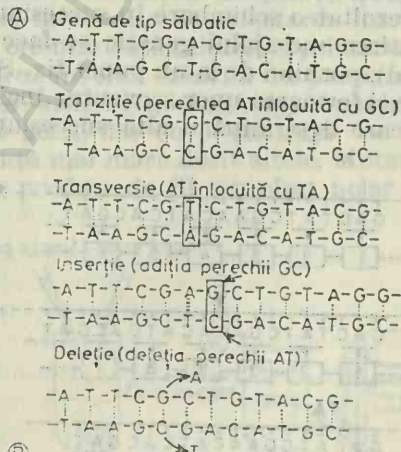


Fig. 172. A. Tipurile de mutații punctiforme. B. Modalitățile de substituire a bazelor purinice și pirimidinice în cursul tranzițiilor și al transversiilor.

2) *Insertia* sau *aditia* apare prin adăugarea unei baze suplimentare în secvența originală. Are drept rezultat apariția unei mutații prin modificarea cadrului de citire a mesajului genetic.

3) *Deleția* corespunde pierderii unei sau mai multor baze din secvența nucleotidică normală. Deci, mărimea segmentului pierdut variază de la un nucleotid (în cazul mutațiilor punctiforme prin microdeleție) până la ~1% din cromosom la *E. coli* (macrodeleție). Mărimea maximă a delețiilor care permite menținerea viabilității bacteriilor depinde de măsura în care includ gene absolut necesare pentru funcționarea și multiplicarea lor. În cazul delețiilor mai mari, posibilitatea reversiei este extrem de rară, datorită dificultății de a reconstitui o secvență mai mare de câteva nucleotide. Ca și aditia, deleția unui nucleotid determină modificarea cadrului de citire a mesajului genetic.

4) *Inversarea* constă în aceea că un număr de baze dintr-un mic segment al catenei de ADN își schimbă ordinea, dispunându-se într-o succesiune inversă față de cea originară.

5) *Transpoziția* sau *translocația* reprezintă o modificare caracterizată prin deplasarea unei secvențe nucleotidice de la situsul său „normal” pe același replicon sau pe altul (cromosom sau plasmidă). La bacterii este realizată de secvențele de inserție, de transpozoni și de unii fagi (λ , Mu etc.). Atât inversarea, cât și transpoziția implică participarea unor mecanisme de recombinare.

Mutația prin modificarea cadrului de citire a mesajului genetic („frame — shift mutation”, „mutants par glissement de cadre”).

Aditia sau deleția unor nucleotide, altfel decât în grupuri de trei, are drept rezultat o schimbare în succesiunea nucleotidelor și a codonilor, deoarece citirea mesajului genetic se face obligatoriu în grupuri de trei baze (codoni), pornind de la un punct fix. Se produce o modificare a cadrului de citire și formarea unor secvențe „încălcate” în aval de sediul mutației (fig. 173), care determină o altă succesiune de triplete și, în consecință

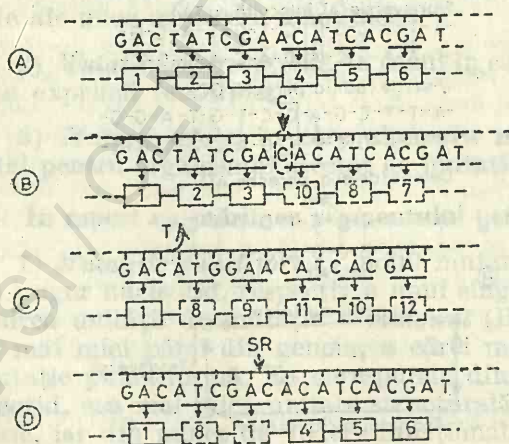


Fig. 173. — Reprezentarea schematică a deplasării cadrului de citire a mesajului genetic prin mutație. A. Secvența normală a unui segment de ADN, care codifică un polipeptid funcțional. Aminoacizii simbolizați prin cifrele 1, 2, 3 etc. sunt codificați, fiecare, de un codon triplet. B. Inserția unui nucleotid citozina (C) determină producerea unui polipeptid nefuncțional prin schimbarea cadrului de citire. C. Deleția unui alt nucleotid (T) determină alt tip de secvență mutațională. D. Recombinarea genetică a secvențelor B și C la nivelul situsului de recombinare (SR), situat între situsurile de inserție și de deleție, determină restabilirea parțială a cadrului de citire corect.

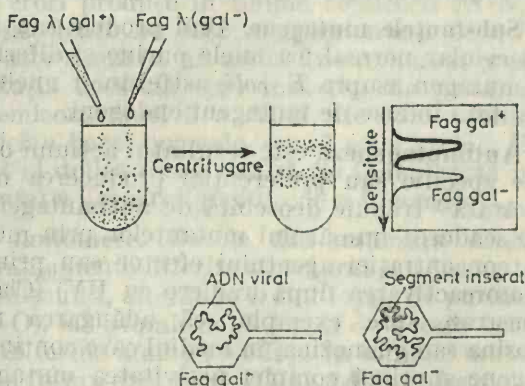
sinteza unei proteine diferită de cea normală, complet inactivă, nefuncțională, lipsită de activitatea catalitică originară. Aceste mutante sunt caracterizate după gradul în care cadrul de lectură diferă față de multiplul nor-

mal de 3 (mutante de tipul „+1”, „+2”, „-1”, „-2”). Caracteristica lor esențială este capacitatea de corectare și de restabilire a cadrului de citire original, cînd două mutații de acest tip, una prin aditie $\ll + \gg$ și alta prin deleție $\ll - \gg$, se produc foarte apropiat, una de alta. În mod similar, 3 aditii sau 3 deleții restabilesc cadrul normal de citire.

Mutațiile prin inserție. Malamy și colab. (1972) au descris sub denumirea de *insertosomi* segmentele de ADN inserate într-un operon bacterian sau viral și au demonstrat că inserția poate determina nu numai inactivarea completă a genei în care s-a făcut inserția ei, freevent, și a genelor dintr-un operon distal față de situsul de inserție (inserție polară).

Conceptul de mutație prin inserție a fost concretizat prin descoperirea elementelor genetice transpozabile (EGT) și a capacității lor de a se integra în diferite situsuri cromosomale și de a produce mutații prin deleție, inversare, duplicare, transpoziție și fuziune. Mutațiile prin inserție includ deci toate tipurile de rearanjări genetice produse de inserția sau, ulterior, de excizia EGT dintr-o genă, operon sau ADN extraeromosomal. Ele se produc cel mai adesea fără influența agenților fizici sau chimici care reacționează cu ADN și sînt dependente de acțiunea enzimelor care produc recombinări „nelegitime”. Inserția într-o genă suprimă funcția genei respective, iar inserția într-un operon produce un efect puternic polar de inhibare a genelor distale față de promotor. Reversia mutațiilor de inserție nu poate fi mărită prin tratarea cu agenți mutageni, fapt care le deosebește de mutațiile obișnuite. Secvențele de inserție (SI) pot stimula sau anula exprimarea genelor, în funcție de orientarea lor în momentul integrării. Astfel, SI 2 într-o orientare stimulează exprimarea genelor *gal*, în timp ce inserate în orientarea inversă exercită un puternic efect polar. Transpozonii (Tn) descriși la *E. coli* și *Salmonella typhimurium* au capacitatea de a se integra în orice genă, dar cu o eficiență variabilă. Unele gene sînt afectate cu o frecvență mai mare decît altele. Mutațiile de inserție produse sînt similare celor produse de SI (au efect polar cînd inserția

Fig. 174. — Evidențierea mutațiilor de inserție prin ultracentrifugarea în gradient de CsCl a particulelor de fag λ *gal*⁺ și *gal*⁻. Particulele *gal*⁻ sînt mai dense, deși toate moleculele componente sînt identice cu cele ale fagilor *gal*⁺, deoarece conțin o moleculă de ADN mai mare: mutația *gal*⁻ este consecutivă inserției unui segment de ADN (după Shapiro și Cohen, 1980).



are loc într-un operon), dar spre deosebire de acestea sînt însoțite de rezistență la antibiotice.

După Rhaese (1980), mutațiile de inserție pot fi produse, în afară de SI și Tn (fig. 174), de plasmide, fagi temperați (λ , Φ 80, P1, P2, Mu) și

probabil de alte sisteme încă neidentificate. Inserția fagilor se poate face precis, la situs specific (λ , Φ 80), aberant la ~ 25 de situsuri accesorii (λ) sau aproape la întâmplare (Mu). Mutațiile de inserție produse de EGT au dobândit o semnificație specială din momentul în care s-a acceptat că ele reprezintă determinantul major al mutațiilor spontane (Drake și colab., 1983).

Mutațiile spontane apar datorită unor cauze necunoscute, în condiții de mediu obișnuite și fără intervenția unui factor mutagen decelabil. Ele sînt modificări \pm permanente necodificate, adică neprogramate, în ceea ce privește natura, numărul sau secvența nucleotidelor în materialul genetic. Sînt rare, deoarece structura d.c. a ADN tinde să se opună apariției lor și pot avea ca sediu la bacterii atît cromosomul, plasmidele, cît și elementele genetice transpozabile cîel puțin o parte din existența lor. Studiul unui număr mare de mutații spontane a permis concluzia că la bacterii predomină mutațiile prin modificarea cadrului de lectură, adică prin inserția sau deleția unei perechi de baze. Această situație ar putea fi doar aparentă, deoarece tranzițiile și transversile au un efect fenotipic mai puțin pronunțat și ar putea trece neobservate. Rata apariției lor poate fi influențată de o serie de factori din mediul extern (nutrienții care limitează creșterea, concentrația O_2 , temperatura etc.). În general o ridicare de temperatură de $10^\circ C$ (în limitele care permit creșterea microorganismelor) mărește de 5 ori rata mutațiilor, prin două mecanisme ipotetice: 1) ruperea ocazională a unei legături activate termic într-un nucleotid („descompunere chimică”) sau 2) creșterea ambiguității decurgînd din fenomenul „wobble”. Rata mutațiilor spontane este influențată nu numai de agenții mutageni fizici și chimici din mediul înconjurător, ci și de interacțiunea dintre factorii mutageni și antimutageni endogeni (prezenți în mediul intern ca rezultat al metabolismului propriu). Dintre aceștia, un rol deosebit în apariția mutațiilor spontane la fagi și bacterii, și probabil prin mecanisme analoge și la alte organisme, au substanțele mutagene, antimutagene și ADN polimeraza cu rol mutator și antimutator.

Substanțele mutagene. Unii produși sau intermediari ai metabolismului celular normal, ca unele purine și derivați derivați ai purinelor, au efect mutagen asupra *E. coli*, astfel încît unele mutații „spontane” pot fi în realitate induse de mutageni endogeni.

Antimutageneza este rezultatul acțiunii oricărui agent sau efect care reduce specific sau preferențial producerea mutațiilor. Antimutageneza „adevărată” trebuie deosebită de antimutageneza aparentă, determinată fie de scăderea numărului mutantelor prin moarte celulară, fie prin scăderea concentrației agentului efector sau prin fenomene reparatorii (de ex., fotoreactivarea după iradiere cu UV) (Clarke și Shankel, 1975). S-a demonstrat, spre exemplu, că adăugarea ribonucleozidelor purinice, adenzina sau guanozina, în mediul care conține una sau mai multe purine mutagene suprimă complet activitatea mutagenă (Novick, 1956).

ADN polimerazele cu rol „mutator” și „antimutator”. Au fost descrise ADN polimeraze virale modificate, produse de gene mutante ale fagului T4, cu rol de agent mutator. Ele măresc de ~ 10 ori rata mutațiilor spontane caracteristică enzimei normale și de peste 20 de ori, dacă

Mg^{2+} din mediu este înlocuit cu Mn^{2+} . Gene cu rol mutator au fost descrise și la *E. coli* și la *Salmonella typhimurium*. Mutațiile la nivelul lor măresc de 100—1 000 de ori rata mutațiilor spontane. Produsul genei mutator care mediază efectul nu a fost identificat (Adelberg, 1974). În schimb, altă categorie de ADN polimeraze modificate reduce de ~10 ori rata mutațiilor spontane și acționează ca agenți antimutatori (Bessman, 1974). Aceste observații permit câteva concluzii.

Existența ADN polimerazelor mutator demonstrează că selecția nucleotidelor pentru sinteza unei noi catene de ADN depinde nu numai de „modelul” care acționează ca „matriță”, ci și de stereospecificitatea polimerazei. Deoarece ADN polimeraza modificată mutațional produce o proporție mărită de „erori de replicare” prin împerecheri „greșite” se poate admite că rata mult mai scăzută a mutațiilor spontane la fagi și bacterii reflectă erorile făcute de aceeași enzimă, în stare normală de tip sălbatic. Ținând seama de rolul crucial al ADN polimerazelor în selecția bazelor și de proprietatea lor de a corecta prin îndepărtare bazele neîmperecheate sau împerecheate greșit, este posibil ca activitatea mutatoare sau antimutatoare să reflecte gradul de eficiență al funcției de corectare („editing”) a erorilor în ADN. În sprijinul acestei concepții s-a demonstrat că mutabilitatea crescută a ADN polimerazei *ts* (mutanta) a fagului T4, care acționează printr-un mecanism similar celui descris în cazul funcției exonucleolitice a ADN polimerazei de la *E. coli* (Brutlag, 1971; Kornberg, 1971; Winkler, 1972), este datorită unor deficiențe în corectarea bazelor legate greșit. Nu se știe însă dacă datele obținute la fagul T4 pot fi generalizate.

Mecanismele moleculare ale mutațiilor spontane

Au fost propuse mai multe ipoteze, teoretic posibile.

1) Ipoteza erorilor de replicare („error in replication”) consideră mutația ca rezultatul unei erori produse în timpul replicării ADN, prin încorporarea unei baze greșite (care nu este complementară celei de pe catena matriță). O bacterie care a suferit un astfel de eveniment premutațional poate completa evoluția acestuia spre mutație, fie printr-un al doilea ciclu de replicare semiconservativă a ADN, fie prin schimbarea imediată fizică sau enzimatică a bazei normale, opusă celei „rele”. Există și posibilitatea ca prin acest al doilea mecanism să fie îndepărtată uneori baza „rea”. În acest caz, mutația „moare” înainte de a fi completă.

Rolul transformărilor tautomere. Bazele din structura ADN sau ARN pot avea mai multe aranjamente diferite structural sau forme tautomere. În forma lor cea mai obișnuită, atomii de O sînt legați de purine și de pirimidine în formă ceto ($=O$), iar atomii de N legați de aceste baze (nu cei din structura ciclurilor), în forma amino ($-NH_2$). În formele tautomere relativ rare, O este prezent în forma enol ($=C-OH$), iar N în forma imino ($=NH$). Bazele purinice și pirimidinice oscilează în mod normal între aceste stări, avînd totuși tendința de a rămîne cel mai mult în stările uzuale ceto și amino. Deși transformările tautomere sînt considerate ca modificări nemutaționale, ele pot genera mutații de tipul tranzițiilor (fig. 175).

Tautomerul obișnuit amino al adeninei (A) formează pereche cu cel obișnuit, ceto, al timinei (T). Dacă însă, în cursul replicării ADN, adenina (A) suferă transformarea la tautomerul mai puțin obișnuit imino se

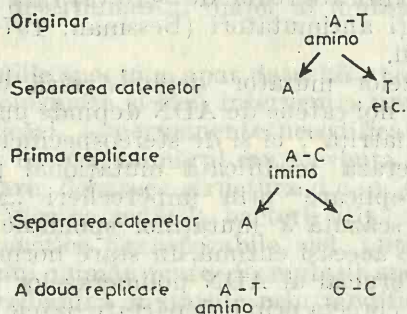


Fig. 175. — Mutatie prin tranziție a ADN dublu catenar, datorită tautomeriei în timpul replicării. Prima replicare produce tranziția T→C, iar cea de-a doua, tranziția perechii de baze AT → GC.

formează o pereche de baze mutante A—C prin legarea de forma amino uzuală a citozinei (C). În acest fel, s-a produs o mutație de tranziție T → C. Dacă în cursul replicării ulterioare ambele baze (A și C) se vor găsi în forma lor tautomeră uzuală, într-una din moleculele din ADN d.c. formate se va găsi perechea de baze A—T, iar în cea de-a doua, perechea de baze G—C, prin care s-a realizat mutația de tranziție de la A—T la G—C. Prin aceste mecanisme, transformarea tautomeră permite apariția unor erori de replicare, care determină formarea unei perechi de baze „incorecte” și producerea de mutații de tranziție în ambele direcții (AT ⇌ GC).

2) Ipoteza reparației eronate („misrepair theory”) necesită o primă leziune a ADN, nemutagenă *per se*, dar care permite intrarea în acțiune a proceselor reparatoare. În cursul acestor procese multienzimatice, asemănătoare căilor metabolice, unele enzime pot face erori în acțiunea de corectare.

3) Ipoteza evenimentelor de recombinare a căpătat o pondere deosebit de importantă odată cu descoperirea plasmidelor cu funcții episomale, a fagilor temperați și a elementelor genetice transpozabile.

Mutageneza indusă

Unii agenți fizici sau chimici au capacitatea de a intensifica evenimentele mutaționale, măbind mult rata apariției lor, deasupra nivelului considerat de bază, al mutațiilor spontane.

Agenții mutageni fizici

Cei mai importanți sînt radiațiile UV și radiațiile ionizate.

Radiațiile UV, cu $\lambda = 254 \text{ nm}$, sînt puternic absorbite de ADN și ca urmare multe bacterii mor, iar la cele supraviețuitoare apar frecvente

mutații induse. Efectul mutagen se datorește celor două tipuri de modificări chimice:

1) hidratarea citozinei la nivelul dublei legături dintre atomii de O, care *in vivo* poate persista suficient pentru a slăbi legătura de H cu purina complementară, determinând o separare localizată a catenei lezate și apariția unor mutații de tranziție;

2) formarea de legături covalente între resturile de pirimidină adiacente pe aceeași catenă (dimeri de pirimidină), care distorsionează forma moleculei de ADN, interferând cu împerecherea normală a bazelor.

Radiațiile ionizante aparțin la două categorii majore, în funcție de valorile LET (Linear Energy Transfer). Radiațiile X, γ și β au valori LET scăzute, iar particulele α și neutronii au valori ridicate. Radiațiile X, spre exemplu, produc mutații punctiforme, prin excitarea grupărilor chimice ale ADN ce duc la modificări complexe; adesea letale sau prin generarea de radicali înalt reactivi în jurul moleculei de ADN, prin hidratarea timinei sau dezaminarea citozinei. Dozele mari produc ruperea legăturilor de H dintre bazele complementare, deleții, rupturi mono- sau dublu catenare ale ADN, rupturi cromosomale etc.

Mutageneza chimică

Agenții chimici mutageni pot fi clasificați după modul lor de acțiune în trei categorii: 1) analogi ai bazelor, care sînt încorporați în ADN și produc erori de replicare (5-bromuracil); 2) agenți care modifică bazele nucleice în așa fel încît produc erori de împerechere sau le labilizează pentru modificări chimice spontane (acidul nitros, agenții alchilanți); 3) agenți care interacționează cu ADN și cu structura sa secundară, producînd distorsiuni locale ale moleculei, favorizînd erori de replicare și de recombinare (coloranții de acridină). Unii agenți mutageni chimici sînt activi *per se*, alții sînt activați prin reacții neenzimatice sau enzimactice ale gazdei (Legator și Flamm, 1973).

Analogii bazelor (2-bromdezoxiuridina (BUDR), 5-bromuracil (5-BU), 5-iodouracil, 2-aminopurina etc.) sînt substanțe asemănătoare ca structură și activitate bazelor care intră normal în structura ADN. Ca urmare, în cursul replicării ADN pot fi încorporate în locul bazelor naturale, fără să afecteze desfășurarea acestui proces. Analogul cel mai mult studiat, 5-BU, este mai asemănător cu timina (T) (înlocuirea grupării $-\text{CH}_3$ cu Br) decît cu uracilul (U). De aceea, cînd replicarea are loc în prezența lui, iar T este absentă sau prezentă în cantități limitate, datorită asemănării mari, se substituie acesteia, formînd împerecheri cu A, ca și T.

Prezența unui analog în ADN introduce o instabilitate chimică, ce duce ocazional la mutații. Instabilitatea decurge din tendința 5-BU de a suferi frecvent, dar tranzitoriu, o rearanjare internă (tautomerie), de la starea uzuală ceto la starea rară, enol. În timp ce în starea „normală” ceto, 5-BU seamănă cu T și se leagă cu A, în starea enol se leagă cu G. Acest mecanism a fost confirmat în cursul sintezei ADN *in vitro*, care a demonstrat existența unei ambiguități mărite în legarea 5-BU comparativ cu T.

Mutageneza cu 5-BU poate apărea pe două căi:

1) O eroare de replicare („instruction error” sau „replication error”), care se produce cînd 5-BU, deja încorporat în ADN în locul T, suferă ocazional o tranziție ceto \rightarrow enol, în timpul replicării, și în consecință G este

incorporată în locul A în catena care va fi sintetizată. În replicarea următoare, G se leagă cu C. Rezultatul este înlocuirea perechii de baze originare A—T cu G—C (fig. 176).

2) Eroarea de încorporare apare când 5-BU în forma sa tautomeră mai rară, corespunzând stării enol, „similară citozinei”, este „confundat” cu aceasta și încorporat ca partener pentru G. În replicarea următoare, 5-BU, revenit la forma sa uzuală ceto, formează pereche cu A, care apoi se leagă cu T, formînd perechea A—T, ceea ce substituie celei originare G—C.

2-aminopurina (2-AP) este mutagenă, de asemenea, pe două căi:

1) O eroare de replicare, decurgînd din împerecherea greșită cu C, din care rezultă tranziția de la perechea originară de baze A—T la G—C.

2) O eroare de încorporare ce duce la o tranziție de la G—C la A—T (fig. 177).

2-AP este incorporată relativ rar în structura ADN (comparativ cu 5-BU). Aceasta sugerează că o mare proporție din 2-AP incorporată este mutagenă.

Mutagenеза prin analogi structurali, în general, are o frecvență mică, deoarece ei intră în competiție cu rezerva celulară de baze naturale, față de care se găsește cantitativ în minoritate (Carlton și Brown, 1981).

Acidul nitros (HNO_2) are capacitatea de a produce dezaminări oxidative, îndepărtînd grupările amino ($-\text{NH}_2$) libere din structura purinelor și pirimidinelor și înlocuindu-le cu o grupare ceto. În acest fel, proprietățile de legare ale bazelor sînt modificate, ceea ce duce la schimbarea bazei complementare în cursul replicărilor ulterioare. Prin dezaminare, adenina (A) este convertită la hipoxantină (H), care are proprietăți de legare similare guaninei (G). Ca urmare, în cursul primei replicări, H se leagă cu citozina (C), producînd tranziția de la T la C. În a doua replicare, se completează tranziția de la A—T la G—C (fig. 178).

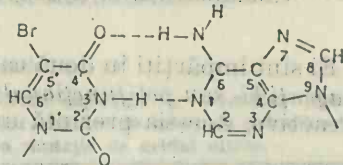
În mod similar, acidul nitros convertește C la U, ale cărui proprietăți de legare sînt similare celor ale T, fapt care duce la o tranziție de la G—C la T—A. În sfîrșit, G este modificată la xantină, care probabil nu produce mutații, deoarece, prin preferința ei de legare cu citozina, se comportă similar guaninei (fig. 178). În concluzie, mutațiile induse de acidul nitros sînt rezultatul înlocuirii unor aminoacizi în proteine, consecutive modificărilor chimice produse ($\text{A} \rightarrow \text{G}$; $\text{C} \rightarrow \text{T}$ (U) în structura ADN (ARN), așa cum demonstrează studiile efectuate pe proteina capsidă a VMT (tabelul nr. 29).

Hidroxilamina (NH_2OH), unul dintre cei mai specifici inductori ai mutațiilor punctiforme, este un agent cu acțiune mai specifică, deoarece produce numai hidroxilarea grupării amino a citozinei, cu formarea unui complex hidroxilamincitozină. Datorită acestei modificări, produce o tranziție mutagenă unidirecțională $\text{GC} \rightarrow \text{AT}$, deoarece C modificată obișnuit în poziția 6 (mai rar în pozițiile 4 sau 5) se leagă cu A, în loc de G; este fără efect asupra T. Ca urmare, acidul nitros, deși acționează printr-un mecanism similar, produce tranziții bidirecționale ($\text{GC} \rightleftharpoons \text{AT}$), în timp ce hidroxilamina acționează numai unidirecțional ($\text{GC} \rightarrow \text{AT}$) (fig. 179).

Agentele alchilante (N- și S-iperita, oxidul etilen, dietil- și dimetil-sulfatul, metilmetansulfonatul (MMS), etilmetansulfonatul, etiletansulfonatul, nitrozoguanidina etc.) formează cel mai mare grup de agenți muta-

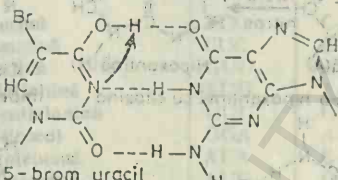
Fig. 176. — Comportarea moleculelor de 5-bromuracil în forma normală ceto (a) și în starea rară enol (b). Ca urmare a unei tranziții tautomere la starea enol se pot produce modificări ale perechilor de baze, în care perechea G — C se substituie perechii A — T (c) sau A — T, G — C (d) (după Strickberger, 1976).

(a) 5-brom uracilul formează pereche cu adenina



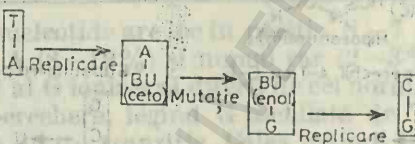
5-brom uracil (formă normală ceto) Adenină

(b) 5-brom uracilul formează pereche cu guanina



5-brom uracil (formă enolică rară) Guanină

(c) Greșeală de replicare (BU încorporat în loc de T formează pereche cu G)



(d) Încorporare greșită a BU în loc de C

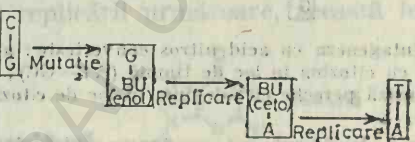
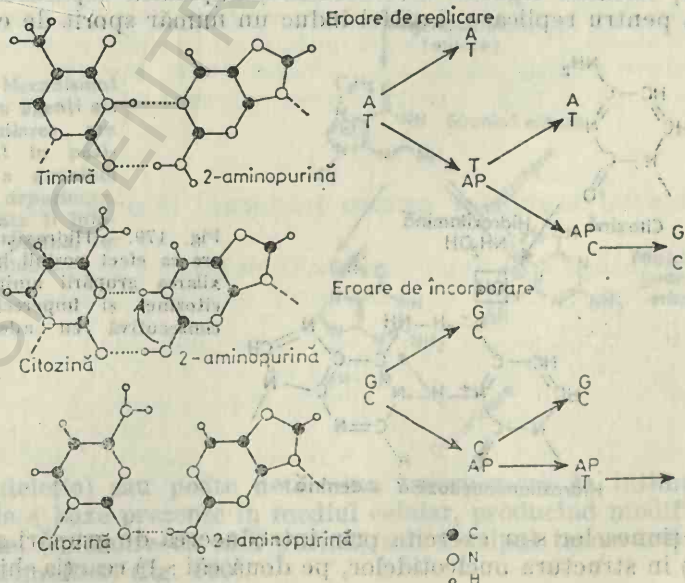


Fig. 177. — Mecanismele mutagenzei induse cu aminopurină.



geni cunoscuți. Ei sînt împărțiți în două categorii distincte : 1) *agenți mono-funcționali* ; 2) *agenți bi- sau polifuncționali* care poartă două sau mai multe grupări alchil reactive. Aceștia prezintă un grad mai mare de citotoxicitate,

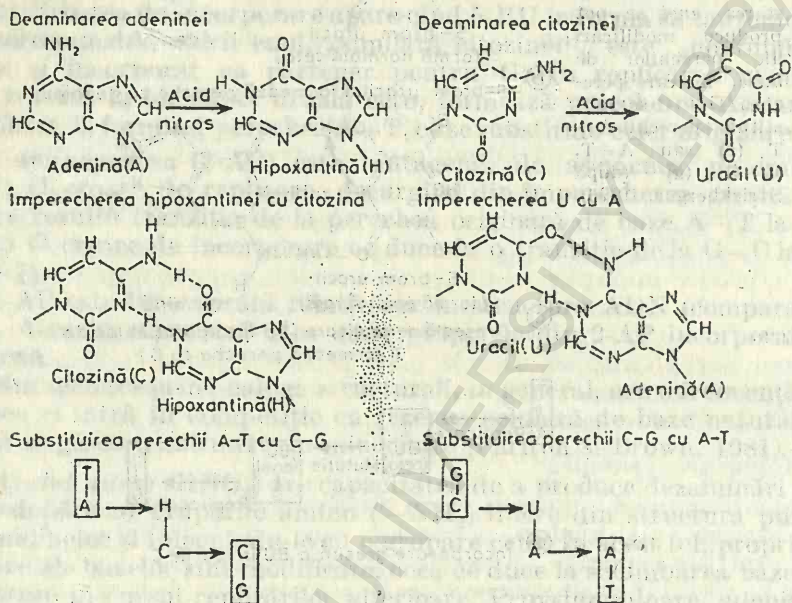


Fig. 178. — Mutagenza cu acid nitros convertește : a) adenina la hipoxantină, care se leagă cu citozina în loc de timină (AT \rightarrow GC); b) citozina la uracil, care formează pereche cu adenina, în loc de citozină (CG \rightarrow TA).

deoarece, formînd legături intercatenare, împiedică separarea catenelor, necesară pentru replicare și astfel induce un număr sporit de efecte letale.

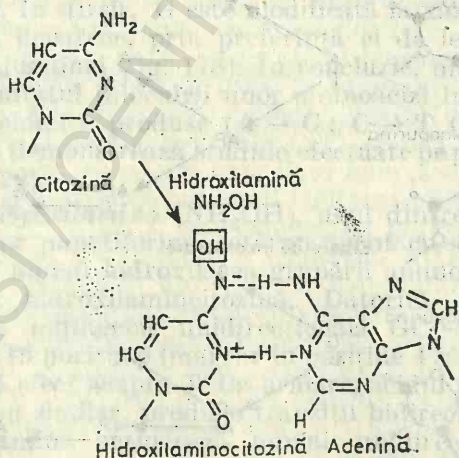


Fig. 179. — Hidroxilamina are ca efect posibil hidroxilarea grupării amino a citozinei și împerecherea consecutivă cu adenina.

Acțiunea lor s-ar exercita prin introducerea de grupări alchil (metil, etil etc.) în structura nucleotidelor, pe două căi : 1) reacția chimică majoră

Tabelul nr. 29

Modificările aminoacizilor în proteina capsidală a virusului mozaicului tutunului ca urmare a schimbărilor chimice în structura codonilor (A→G; C→U) induse prin mutație de acidul nitros

Aminoacidul original	Codonul original	Aminoacidul modificat	Codonul modificat	Nucleotidul înlocuit
Prolină	CCC	Serină	UCC	C→U
Prolină	GGC	Leucină	CUC	C→U
Izoleucină	AUU	Valină	GUU	A→G
Izoleucină	AUA	Metionină	AUG	A→G
Leucină	CUU	Fenilalanină	UUU	C→U
Acid glutamic	GAA	Glicocol	GGA	A→G
Treonină	ACA	Izoleucină	AUA	C→U
Treonină	ACG	Metionină	AUG	C→U
Serină	UCU	Fenilalanină	UUU	C→U
Serină	UCG	Leucină	UUG	C→U
Acid aspartic	GAC	Glicocol	GGC	A→G

între agenții alchilanți și nucleotide are loc în poziția N-7 a guaninei (G) (79—92%), în poziția 3 a A (8—19%) și numai rar (2—3%) în poziția 1 a A. Produsul N-7 alchilat al G ionizează diferit de cel normal și, ca urmare introduce o eroare de împerechere, legind G alchilată de T, în loc de C, producând astfel o mutație de tip tranziție. Calea majoră însă, pare să fie cea în care prezența grupării alchil la N-7 al G labilizează legătura β-glucozidică, ducând la eliminarea G (depurinare) și producerea unei breșe în structura ADN. În cursul replicării următoare, această leziune poate fi

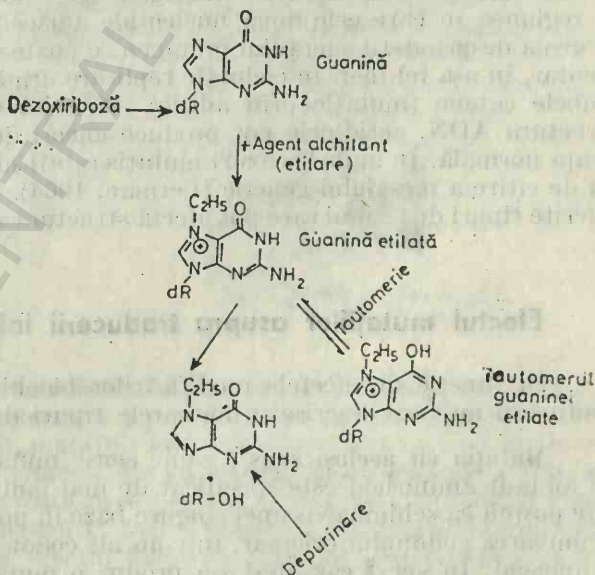


Fig. 180. — Mecanismul mutagenzei cu agenți alchilanți. Alchilarea are loc preferențial în poziția a șaptea a guaninei determinând o depurinare. Baza lipsă poate fi înlocuită, fie cu o purină, fie cu o pirimidină.

„ignorată” (deleție) sau poate determina încorporarea la întâmplare a uneia din cele 4 baze prezente în mediul celular, producând modificări de tipul tranziției (înlocuire cu altă purină) sau de tipul transversiei (înlocuire cu o pirimidină) (fig. 180).

Acridinele (proflavina, acridinoranj etc.) sînt molecule plane, cu structură ciclică (fig. 181), similară unor baze. Ele interacționează direct cu molecula de ADN, fără a forma legături covalente, intercalindu-se între două nucleotide adiacente și inducînd alterări ale acestora ca : 1) alungirea de la 34 la 68 nm ; 2) modificarea vitezei de sedimentare și a viscozității ;

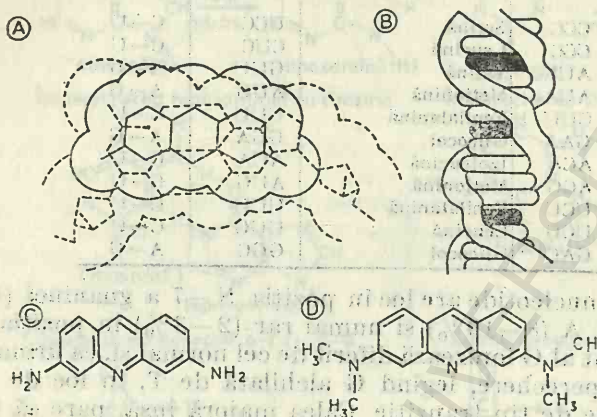


Fig. 181. — Mutagenza indusă de coloranți de acridină. A. Inserția proflavinei între perechile de baze ale ADN. Molecula de ADN d.c. este văzută de sus. Una dintre perechile de baze situată sub structura acridinei (linie continuă) este prezentată cu linii întrerupte. B. Vedere laterală a moleculei de acridină intercalată. C. Formula chimică a proflavinei. D. Formula chimică a moleculei de acridin-oranj (după Lerman, 1964; Drake, 1970).

3) producerea unui grad de derulare locală necesară pentru a crea spațiul în care este inserat agentul mutagen. În momentul replicării ADN, în regiunea în care cele două nucleotide adiacente sînt mai îndepărtate, în urma desprinderii agentului mutagen se poate insera un nucleotid suplimentar, în așa fel încît în ciclul de replicare următor, înlocuirea are loc pe ambele catene (mutație prin adiție). Datorită distorsiunilor produse în structura ADN, acridinele pot produce uneori deleția unor baze din secvența normală. În ambele cazuri mutația este însoțită de deplasarea cadrului de citire a mesajului genetic (Lerman, 1964). Fig. 182 prezintă sintetic diferite tipuri de leziuni care pot afecta structura ADN în cursul mutațiilor.

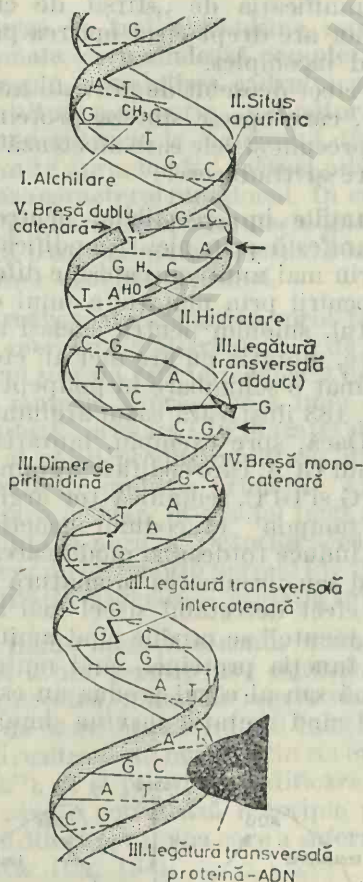
Efectul mutațiilor asupra traducerii informației genetice

În funcție de efectele modificărilor biochimice mutaționale asupra traducerii au fost descrise următoarele tipuri de mutații :

Mutația cu același sens („same sense mutation”). În cazul în care un anumit aminoacid este specificat de mai mulți codoni (cod degenerat) este posibil ca schimbarea unei singure baze în poziția a treia să determine schimbarea codonului original, într-un alt codon care codifică însă același aminoacid. În acest caz, deși s-a produs o mutație datorită caracterului degenerat al codului genetic, nu are loc o substituție de aminoacizi. Astfel, modificarea mutațională a unui nucleotid din codonul AAA (corespunzînd lizinei în proteina de tip sălbatic) la AAG, care corespunde tot lizinei, nu se însoțește de nici o modificare în structura proteinei.

Mutația cu sens greșit sau fals-sens („missense mutation”) constă în înlocuirea unui nucleotid cu altul și are ca efect, în majoritatea cazurilor, modificarea unuia din cei 61 de codoni-sens și înlocuirea unui aminoacid prezent în mod normal într-o proteină, cu altul. Efectul fenotipic este vari-

Fig. 182. — Modificările structurale ale ADN d.c. induse de radiații sau agenți chimici pot fi clasificate în cinci categorii: I) distorsiuni neglijabile ale helixului, după alchilarea unei baze; II) distorsiuni minore produse de absența unei baze sau de hidratarea ei; III) distorsiuni majore produse prin inserția unei legături transversale, care leagă două baze pentru a forma un dimer, o legătură încrucișată între două catene sau între o catenă și o proteină; IV) ruperea unei catene; V) ruperea ambelor catene.



abil în funcție de natura aminoacidului înlocuit, de rolul său în menținerea structurii terțiare sau cuaternare a proteinei sau în configurația situsului său activ. În mod obișnuit, mutațiile fals-sens au ca efect variații ale specificității sau proprietăților cinetice ale enzimelor, modificări ale stabilității termice etc. În timp ce substituția prolinei într-o regiune helicală a proteinei distruge restul structurii și, foarte probabil, suprimă activitatea polipeptidului, în alte cazuri, efectul fenotipic este nul: astfel, treonina sau alanina se pot substitui altor aminoacizi, fără efect asupra structurii proteinelor. Mutațiile fals-sens la nivelul codonilor terminatori (stop) îi convertește în codoni-sens (care codifică aminoacizi) și determină formarea unei proteine anormale ca lungime, deoarece codonii-stop modificați nu își mai pot exercita funcția normală.

Mutațiile nonsens sînt rezultatul substituirii unei baze sau modificării cadrului de citire a mesajului genetic, ce determină apariția unui codon nonsens (UAG, UAA, UGA). Pot apărea în orice punct al unei gene date și pot afecta orice caracter fenotipic. Codonii nonsens sînt numiți astfel deoarece nu le corespunde nici un aminoacid în „dicționarul” genetic, ei avînd semnificația de „sfîrșit de citit mesajul genetic” (codoni-stop). Apariția lor are drept efect oprirea prematură a sintezei și formarea unui polipeptid incomplet.

Un efect deosebit de grav au mutațiile nonsens în genele operator și promotor, care opresc sinteza proteinelor în unitatea de transcriere respectivă, precum și cele care afectează enzimele și „mașinăria” de replicare, transcriere și traducere.

Mutațiile imperceptibile, neutre sau „tăcute” („silent mutations”) nu se manifestă prin nici o modificare perceptibilă fenotipic. Ele se pot realiza prin mai multe mecanisme diferite. Cel mai frecvent, ele sînt rezultatul înlocuirii prin mutație a unui codon specific pentru un aminoacid cu un altul, sinonim pentru același aminoacid (mutație cu același sens). Ca urmare, mutația nu are nici un efect și rămîne nedectată, deoarece nu a determinat o schimbare în polipeptid.

Fig. 183 ilustrează cazul argininei care este codificată de șase codoni diferiți. Dacă, spre exemplu, mutația produce substituirea bazei a treia din codonul GCA, care codifică arginina, ceilalți trei codoni care pot rezulta, GCT, GCG și GCC, semnifică tot arginina. Acest tip de mutație ilustrează „efectul tampon” al codului genetic degenerat. Dacă mutația într-un codon ar induce totdeauna modificarea semnificației lui și inserția unui alt aminoacid sau terminarea prematură a sintezei polipeptidului, mutația ar avea un efect detectabil și cel mai adesea dăunător. Celelalte tipuri de mutații „tăcute” se produc cînd aminoacidul introdus prin substituție nu modifică funcția proteinei, cînd mutația se produce într-o genă care nu se exprimă sau al cărui produs nu este absolut necesar în circumstanțele testării și cînd mutația survine simultan cu altă mutație supresor.

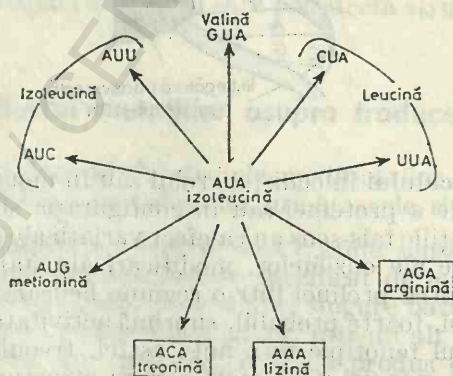


Fig. 183. — Reprezentarea schematică a efectului mutațiilor punctiforme. Substituirea bazelor în cele trei poziții ale codonului AUA (izoleucină) din ARNm determină formarea a nouă codoni diferiți, care codifică șase aminoacizi diferiți. Datorită redundanței codului genetic, unele mutații punctiforme nu modifică poziția unor aminoacizi. Codonii încadrați specifică aminoacizii cu proprietăți chimice net diferite de cele ale izoleucinei.

Mutațiile supresoare apar la microorganisme care au fost afectate de o mutație anterioară. Ele au ca efect corijarea sau suprimarea efectului mutației inițiale, ca rezultat al unei mutații situată pe molecula de ADN,

într-o poziție deosebită de cea a mutației originare. Aceste mutații sînt de două tipuri: 1) *intragenice*, situate într-un situs diferit, dar în aceeași genă ca și mutația inițială; 2) *extragenice* ce se produc la nivelul unor gene diferite și acționînd, în special indirect, la nivel metabolic.

După Gorin și Beckwith (1966), supresia se poate realiza pe două căi fundamental diferite:

1) *Supresia directă* poate recurge la trei mecanisme moleculare: a) introducerea unei modificări adiționale, care anulează complet sau parțial efectul mutației primare (de exemplu, restabilirea cadrului normal de citire); b) înlocuirea unui codon cu altul, mai puțin „dăunător” pentru funcția proteinei; c) substituirea unui aminoacid la o anumită distanță de mutația primară cu un altul care permite aproximativ aceeași pliere a proteinei finale, permițîndu-i să-și păstreze caracterul funcțional. În cazul triptofansintetazei de la *E. coli*, mutația primară care înlocuiește glicocolul cu acidul glutamic poate fi corectată dacă o a doua mutație, situată la distanță de 36 de aminoacizi „în aval”, substituie cisteina tirozinei.

2) *Supresia indirectă* se poate realiza, de asemenea, prin trei mecanisme distincte: a) crearea unei căi metabolice alternative („de ajutor”), avînd rolul de a forma produsul a cărui sinteză este împiedicată de mutația primară sau intensificarea de către mutația supresoare a unei activități reziduale scăzute, determinată de mutația primară; b) mutația supresoare este localizată la nivelul unei gene, al cărui produs modificat de mutație îl poate înlocui pe cel al genei afectate de mutația primară; c) mutația supresoare poate modifica mediul intern celular, în așa fel încît structura produsului genei mutante este restabilită la normal. Datorită acestor particularități, bacteriile cu mutații supresor au un fenotip normal (de tip „sălbatic”), dar un genotip dublu mutant (mutația originară + mutația supresoare).

Mutațiile de reversie. Cele mai multe mutații constau dintr-o schimbare de la tipul sălbatic sau normal la un genotip nou mutant (așa-zisa mutație „înapoi”). Prin contrast cu acestea, mutațiile regresive sau „înapoi” (mai rare) determină revenirea de la genotipul mutant la cel originar. Reîntoarcerea la tipul sălbatic poate fi realizată nu numai prin reversia modificării originare (reversia „adevărată”), ci și printr-o modificare mutațională survenită într-un situs diferit care o corectează fenotipic pe prima. Pentru a deosebi cele două mecanisme diferite, tulpina care a suferit reversia este încrucișată cu cea de tip sălbatic (fig. 184).

În cazul reversiei „adevărate” toate bacteriile progene vor fi de tip sălbatic. În cazul supresiei, deoarece mutația inițială nu a fost îndepărtată, unele celule progene vor avea caracterul de mutant, rezultînd din recombinarea genomului mutant cu cel de tip sălbatic.

Mutațiile prin reparație greșită („missrepair mutation”) necesită existența unei leziuni a ADN, care declanșează intrarea în acțiunea sistemelor de reparație. Procesul reparator la care participă mai multe enzime implică, în general, o mică replicare a ADN, necesară pentru „umplerea” reparatorie a breșelor. De aceea, mutageneza prin reparație greșită reprezintă, a priori, posibilitatea acestor enzime de a face — rareori — o greșeală în activitatea lor. În mod particular, în acest sens acționează sistemul reparator SOS, caracterizat printr-o predispoziție deosebită la erori.

Mutațiile polare reprezintă o categorie aparte de mutații care, pe lângă faptul că alterează structura și funcția genei în care apar, diminuează activitatea altor gene din același operon. Astfel, în cazul operonului *lac*,

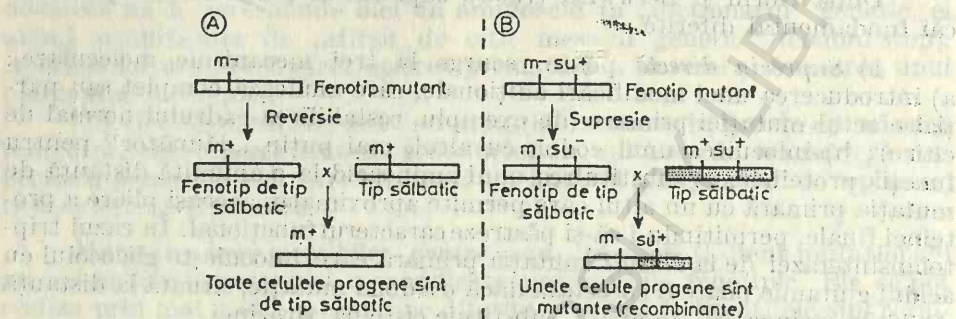


Fig. 184. — Mecanismele mutațiilor de reversie. A. Locusul mutant însuși (m^-) suferă o reversie (m^+), care determină revenirea la fenotipul sălbatic. După încrucișare cu o tulpină de tip sălbatic celulele progene sînt toate de tip sălbatic (cu excepția foarte rarelor cazuri de mutații în locusul m). B. Modificarea fenotipului mutant este produsă de o mutație la un locus supresor (su). Când tulpinile supresate $m^- su^-$ sînt încrucișate cu cele de tip sălbatic $m^+ su^+$, unii descendenți vor fi $m^- su^+$ (fenotip mutant) din cauza recombinării și vor apărea, de regulă, cu o frecvență mult mai mare decît rata mutației în locusul m (după Strickberger, 1976).

mutația polară în gena z este z^- , deoarece împiedică sinteza β -galactozidazei. Ea are însă și efecte adiționale, diminuînd gradul de exprimare al genelor y și a (situate distal în operon, fig. 282).

Mutațiile polare în gena y , pe lângă faptul că suprimă activitatea acesteia, interferă în mod similar cu exprimarea genei distale a , dar nu și cu cea a regiunii proximale (z) a operonului.

Gradul de influență asupra genelor distale diferă de la o mutantă la alta. În cazuri extreme, polaritatea mutațiilor poate suprima integral activitatea genelor distale.

Efectele mutațiilor asupra fenotipului bacteriilor

Studiile de anatomie, fiziologie și genetică bacteriană au dus la concluzia că numeroase particularități biologice ale acestor organisme sînt rezultatul unor mutații.

Mutațiile care afectează morfologia celulei. Prezența structurilor anatomice accesorii ale bacteriilor este controlată genetic și, ca urmare, unele mutații pot determina pierderea lor. Astfel, bacteriile flagelate (fla^+) sau cele fimbriate (fim^+) pot prezenta mutante imobile (fla^-) sau nefimbriate (fim^-). Bacteriile sporulate pot produce variante asporogene, dar, în acest caz, mutația pare a fi datorită în special „represiei” traducerii genelor respective. Tulpinile capsulate pot avea variante necapsulate, ca rezultat al pierderii prin mutație a capacității de formare a enzimelor care

dirijează biosinteza constituenților capsulari. În anumite condiții, mutația poate afecta chiar existența peretelui celular. Mureina conține acid diaminopimelic (ADAP), format ca ultim intermediar în biosinteza lizinei. Dacă mutația inactivează o enzimă care intervine în calea respectivă, înainte de formarea ADAP, bacteria va necesita pentru creștere atât ADAP, cât și lizină. Dacă i se furnizează ADAP va crește normal, folosindu-l atât pentru formarea mureinei, cât și pentru sinteza lizinei. Dacă mediul conține doar lizină aceasta este utilizată în sinteza proteinelor și celula lipsită de ADAP va avea un perete osmotic fragil. În medii obișnuite ea se va liza, iar în medii izo- sau hiperosmotice va produce forme L ale bacteriei respective. Gavrila și Mihăiescu (1982) au descris apariția unui larg spectru de modificări morfologice și pigmentare prin tratare cu nitrozoguanidină la *Synechococcus elongatus* (filamente lungi neseptate și ramificate) și la *Nostoc* sp. (ramificări, distorsiuni, mărirea celulelor, heterochiști terminali numeroși, anastomoza celulelor terminale sau intercalare etc.).

Mutațiile care afectează morfologia coloniilor. Apartenența coloniilor bacteriene la un anumit tip morfologic este determinată, în mare măsură, de morfologia și structura de suprafață a celulelor (caractere controlate genetic), care determină modul de aranjare a celulelor rezultate din diviziune. Schimbările de morfologie colonială („S”, „R”, „M” etc.) reflectă, în ultimă instanță, mutații biochimice legate de modificări în prezența sau activitatea enzimelor care controlează, direct sau indirect, sinteza unui anumit component de suprafață al celulei.

Mutațiile biochimice. Sub denumirea de „mutante biochimice” sînt remite în mod convențional (deoarece, de fapt, orice mutație este de natură biochimică) toate tulpinile bacteriene care au pierdut sau cîștigat anumite particularități de nutriție sau care prezintă modificări ușor de recunoscut ale unor procese enzimatice. Se consideră, de asemenea convențional, că forma normală a unei tulpini bacteriene, întilnită în mod obișnuit în natură, corespunde tipului său sălbatic, reprezentat de forma prototrofă. Mutantele auxotrofe nu se pot dezvolta pe medii minimale decît dacă sînt suplimentate cu factori de creștere (aminoacizi, purine, pirimidine, vitamine etc.), pe care în urma unei mutații nu îi mai pot sintetiza. În unele cazuri, aceeași tulpină are mai multe incapacități de sinteză, fiind poliauxotrofă. Uneori, poliauxotrofia este consecință pierderii unei singure enzime, care determină simultan mai multe deficiențe. Spre exemplu, pierderea unei enzime care duce la formarea acidului chorismic, face celula dependentă de fenilalanină, tirozină și triptofan. Pierderea capacității de a folosi un anumit substrat (mutantele catabolice) poate fi datorită, fie unei deficiențe enzimatice (în cazul lactozei, lipsa β -galactozidazei), fie pierderii activității de transport (β -galactozidpermeaza).

Mutațiile genelor de reglare nu afectează enzimele, ci concentrația lor în celulă. În cazurile în care mutația suprimă producerea de represor, gena controlată de acesta este permanent funcțională (*mutante constitutive*) și asigură sinteza produsului său, chiar cînd acesta nu este necesar (*mutante „neinteligente”*).

Mutantele avirulente apar în urma pierderii unora dintre atributele celulei bacteriene care-i asigură puterea de invazie, cum ar fi capacitatea

de sinteză a hialuronidazei, a agresinelor etc., sau rezistența la acțiunea forțelor de apărare ale organismului-gazdă, așa cum sint prezența capsulei, a unor antigene de suprafață etc.

Mutantele de rezistență la diferite substanțe chimice măresc toleranța bacteriilor față de diferite substanțe antimicrobiene și în mod particular față de substanțele antibiotice și chimioterapice. Au o importanță deosebită în patologia umană și animală.

Mutațiile pleiotrope au particularitatea de a conferi celulei afectate modificarea simultană a două sau mai multe proprietăți diferite, deoarece produsul primar sau secundar al genei are mai mult de o funcție. Spre exemplu, mutația care afectează sinteza unei enzime din calea biosintetice a polizaharizilor capsulari la *Streptococcus pneumoniae* lipsește celulele respective de prezența capsulei (*mutantă morfologică*), care se însoțește de alte trei modificări fenotipice secundare : 1) pierderea antigenelor polizaharidice (*mutantă antigenică*); 2) scăderea virulenței (*mutante avirulente*) și 3) schimbarea tipului de colonie de la „S” la „R” (*mutantă de morfologie colonială*). În mod similar, mutația care inactivează enzima răspunzătoare de adăugarea unui glucid terminal la polizaharidul peretelui celular de la *Salmonella*, determină simultan, modificarea structurii antigenice și rezistența la fag, deoarece polizaharidul este atit un component esențial al antigenului, cît și receptor specific de fag.

Mutantele „comportamentale”, descrise de Armstrong și Adler (1967, 1976), provin din bacterii normal mobile, care devin incapabile să „înoate”, din cauza pierderii flagelilor sau prezenței unor flageli nefuncționali, sau prezintă alterări generale ori specifice ale chemotaxiei. Mutantele „general nechemotactice” sint areactive față de toți atractanții sau repelenții și apar ca rezultat al lezării a cel puțin patru gene. Mutantele „specifice” au pierdut capacitatea de a fi atrase sau respinse de o anumită substanță sau grup de substanțe înrudite, ca rezultat al modificării informației genetice, la nivelul unor sisteme de detecție care devin defective.

Mutantele de replicare, descrise la *E. coli*, prezintă modificări genetice care pot interveni în diferite etape ale replicării ADN : blocarea formării de noi bifurcații de replicare sau stoparea rapidă a celor preexistente, pierderea capacității de formare a ARN primer, blocarea polimerazelor sau inactivarea ligazei, însoțită de formarea unui număr mare de fragmente de ADN nelegate între ele.

Gama modificărilor mutaționale la bacterii este mult mai mare. Ele pot include modificări ale capacității de pigmentogeneză, rezistența la fag, producerea modificată (diminuată sau în exces) a unui produs final sau a unei fermentații etc.

Mutațiile letale determină pierderea activității produsului primar al unei gene, esențial pentru viața și reproducerea celulei, în toate condițiile de cultivare. În această categorie intră mutațiile care afectează enzimele implicate în replicarea ADN, biosinteza proteinelor, diviziunea celulară, proteinele de membrană, iar în cazul virusurilor cele cu rol în sinteză și asamblarea compuşilor virali.

Mutațiile condiționat letale („Conditional lethal mutation”) sint mutații al căror caracter letal nu se exprimă decit în anumite condiții de

mediu; condițiile în care mutația letală se exprimă ca atare se numesc restrictive sau nepermissive, pentru că nu permit dezvoltarea bacteriilor sau virusurilor, în timp ce condițiile în care nu se exprimă letal se numesc permissive. Cele mai cunoscute sînt mutantele termosensibile și cele supresibile genetic, descrise la fagi.

Mutantele termosensibile, descrise la bacterii și fagi, reprezintă un tip special de mutante fals-sens sau parțial fals-sens. Ele sînt caracterizate prin anumite alterări în secvența aminoacizilor, care modifică legăturile interne ale proteinelor, iar structura lor secundară și terțiară rămîne compatibilă cu funcția biologică, nu însă la temperaturi ridicate. Datorită modificărilor impuse în stabilitatea termică, enzimele afectate devin nefuncționale cînd temperatura ambiantă se apropie de limita superioară a zonei fiziologice (39°C – 42°C); rămîn însă active la temperaturi situate spre limita inferioară (25°C – 30°C).

Datorită acestor particularități, unele mutante de *E. coli* pot fi cultivate numai la 30°C (condiția permisivă), deoarece unele proteine esențiale afectate de mutație sînt termosensibile sau termolabile. În mod similar, unii fagi T4, afectați de acest tip de mutații, formează plaje de liză la 28°C , nu însă și la 43°C , cînd celulele de *E. coli* infectate conțin cozi complete de fagi, nu și capete. Bacteriile nutrițional auxotrofe pot fi considerate ca mutante condiționat letale. Ele pot supraviețui numai dacă mediul este suplimentat cu nutrienții pe care nu îi pot sintetiza.

Mutantele supresibile (mutante nonsense; mutante amber) au fost descrise la anumiți fagi T4 incapabili să se replice într-o celulă bacteriană de tip sălbatic. Ei se replică normal și formează plaje numai dacă infectează o bacterie care poartă o genă supresor corespunzătoare codonului nonsense.

Evoluția expresiei fenotipice

Perioada de lag fenotipic. Numeroase fapte de observație demonstrează existența unei perioade de tranziție între momentul tratării bacteriilor cu agenți mutageni și apariția fenotipului mutant. Unele mutații induse necesită trecerea a ~ 14 generații bacteriene înainte de a fi exprimate (fig. 185). Durata perioadei de tranziție depinde în parte de natura

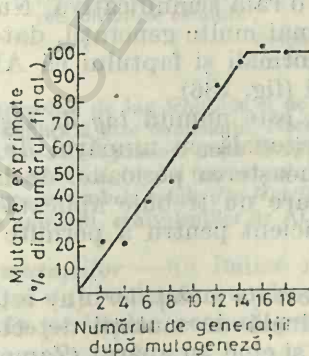


Fig. 185. — Întîrzierea în exprimarea fenotipică a mutației. O suspensie de bacterii sensibile la fagi este tratată cu un agent mutagen, iar celulele supraviețuitoare sînt dispersate pe o placă de agar acoperită cu o suspensie de fagi. Se dezvoltă numai mutantele induse, rezistente la fag. În experiment, bacteriile supraviețuitoare au fost lăsate să producă un număr variabil de generații, înainte de a fi dispersate pe plăci.

produsului final al genei afectate și de rata de turnover a unor molecule (ARNm bacterian este instabil în comparație cu proteinele și cu celelalte tipuri de ARN).

Datorită acestor particularități, bacteriile sensibile la fag, spre exemplu, expuse agenților mutageni rămân ca atare, dacă sînt însăminate imediat, rezistența la fag manifestîndu-se numai dacă au fost lăsate mai multe generații în bulionul de cultură. Această comportare se explică prin faptul că în momentul tranziției genetice la rezistență, ele posedă încă receptorii naturali de fag preexistenți ai formei sensibile. Ulterior, receptorii nu mai sînt sintetizați, iar cei vechi dispar prin formarea de perete celular nou. Expresia fenotipică a rezistenței întîrzie pînă cînd numărul receptorilor este atît de mic, încît celula mutantă nu mai permite adsorbția fagului. Perioada de lag fenotipic apare foarte evidentă ori de cîte ori efectul mutației este pierderea unui produs stabil al genei, ca, de exemplu, în cazul mutației prototrof → auxotrof, care implică pierderea anumitor enzime.

În momentul apariției mutației, celula conține încă numeroase enzime care trebuie degradate sau diluate prin creștere și diviziune, înainte ca efectul mutației să fie observabil. Dacă mutația determină un câștig de proprietăți (reversia auxotrof → prototrof), expresia fenotipică va fi mai promptă, dar se va manifesta numai cînd noul produs sintetizat va ajunge într-o concentrație care permite evoluția reacției cu o rată semnificativă. Perioada de lag fenotipic maschează fenomenul molecular care întîrzie exprimarea fenotipică a mutației și anume faptul că în perioada de creștere activă bacteriile conțin mai mulți echivalenți genomici și că mutația a survenit numai la nivelul unuia. Celula devine un heterocariion (merodiploid) tranzitoriu (Birge, 1981). Dacă mutația produce pierderea unui produs al genei ea va fi recesivă, pentru că genomurile normale vor continua să codifice produsul normal, iar merodiploidul va conține două tipuri de ADN, mutant și nemutant (fig. 186). Exprimarea fenotipică a mutației necesită cîteva generații pentru ca prin segregare nucleară să apară o celulă mutantă homocariotă (care conține 1 sau mai mulți cromosomi identici) (Adelberg, 1970).

Perioada de lag de segregare. Dacă mutația conferă capacitatea de a efectua un anumit proces biochimic, ea are caracter dominant, dar se va manifesta numai cînd noul produs sintetizat va ajunge într-o concentrație care permite ca reacția să aibă loc cu o rată semnificativă. Numărul celulelor cu fenotip mutant poate crește mai multe generații, datorită numărului mare de echivalenți genomici normali și faptului că ADN replicat nu segregă decît după cîteva generații (fig. 186).

Întîrzierea prin acest mecanism este numită *lag de segregare* („lag segregation”) și are o durată proporțională cu numărul de echivalenți genomici pe celulă (Birge, 1981). Cunoașterea perioadei de lag fenotipic are o mare importanță în selecție, care nu trebuie aplicată imediat, ci numai după un interval de timp suficient pentru a permite exprimarea fenotipului mutant.

Frecvența și rata mutațiilor. *Frecvența mutațiilor* (α) este un indice a cărui valoare exprimă proporția finală de mutații detectabile într-o populație, indiferent de modul în care și cînd au apărut (Zamenhof, 1967). El se obține raportînd numărul total al mutantelor (M), la numărul total al bacteriilor din populație, după ecuația $\alpha = \frac{M}{N}$. Valoarea sa depinde

de o serie de factori și în primul rând de momentul apariției mutației (precoce sau tardiv), în cultura pe cale de creștere. De aceea, frecvența mutațiilor poate fi utilizată numai ca valoare aproximativă, pentru a caracteriza „mutabilitatea” unei gene sau a unui grup de gene.

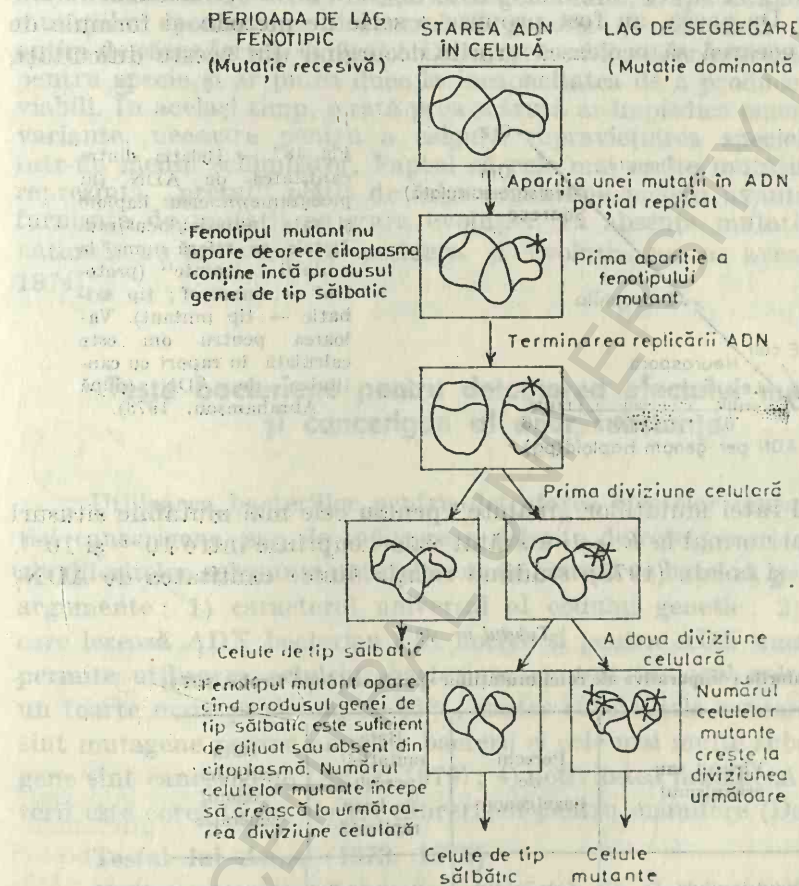


Fig. 186. — Perioadele de lag fenotipic și de lag de segregare. Dacă mutația (X) care apare într-o regiune duplicată este dominantă, efectul ei fenotipic este observat imediat, dar numai una dintre celulele-surori produse după diviziune este mutantă (*lag de segregare*). Dacă mutația este recesivă, apariția fenotipului mutant este întârziată până la a doua diviziune celulară, când ADN este omogen în ambele celule (*lag fenotipic*). Durata efectivă a fiecărui tip de lag este în funcție de numărul echivalenților de ADN genomic din celulă (după Birge, 1981).

Rata mutațiilor — un indice mult mai exact — exprimă probabilitatea apariției unui anumit eveniment mutațional/celulă bacteriană/generație (adică în perioada necesară pentru un ciclu de reproducere) *. Măsu-

* În general, se recomandă calcularea ratei mutațiilor raportat la unitatea de timp. Cind fiecare ciclu de diviziune sau de generație necesită aceeași durată de timp, ca în cazul bacteriilor cultivate în condiții optime, rata mutațiilor poate fi calculată luind ca unitate de timp durata unei generații (Novick și Szilard, 1951).

rarea ei la bacterii este mai dificilă decât la alte organisme datorită numărului mare de celule și ritmului rapid de diviziune. Aceasta deoarece viteza mutației pentru un caracter dat este exprimată ca mutație/bacterie/diviziune celulară, în timp ce cantitățile observabile sînt numărul total al bacteriilor la începutul și la sfîrșitul experimentului, ca și numărul celulelor mutante. De aceea, au fost propuse o serie de metode și formule de calcul care încearcă să ocolească erorile decurgînd din aceste dificultăți.

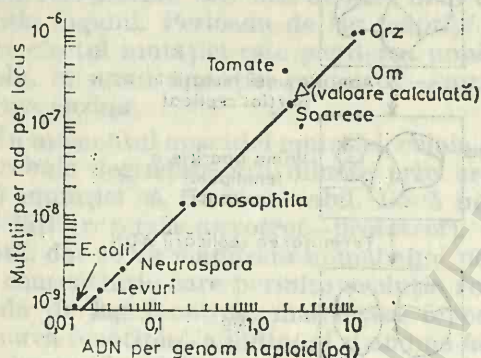


Fig. 187. — Relația dintre cantitatea de ADN (în picograme)/nucleu haploid și rata mutației/locus/rad. Datele se referă numai la mutații „înainte” (prototrof → auxotrof; tip sălbatic → tip mutant). Valoarea pentru om este calculată în raport cu cantitatea de ADN (după Abrahamson, 1973).

Studiul ratei mutațiilor „înainte” pentru cele mai mutabile situsuri ale genomului normal la *E. coli* a arătat valori cuprinse între 10^{-6} și 10^{-8} . Abrahamson și colab. (1973), studiind relația dintre cantitatea de ADN/

Tabelul nr. 30

Valorile comparative ale ratei mutațiilor spontane (după Drake, 1974)

Virusul sau organismul	Perechi de baze/genom	Rata mutației/pereche de baze replicată	Rata mutației/genom/generație
Fagul lambda	$4,7 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-8}$	0,001
Fagul T4	$1,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-8}$	0,002
<i>Salmonella typhimurium</i>	$3,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-10}$	0,001
<i>Escherichia coli</i>	$3,8 \times 10^6$	$4,0 \times 10^{-10}$	0,002
<i>Neurospora crassa</i>	$4,5 \times 10^7$	$5,8 \times 10^{-11}$	0,003
<i>Drosophila melanogaster</i> *	$4,0 \times 10^8$	$8,4 \times 10^{-11}$	0,93

* valori per genom diploid (per generație de *Drosophila*; nu de celule).

nucleu haploid și viteza mutațiilor „înainte” (prototrof → auxotrof; tip sălbatic → mutant)/locus/rad, în condiții de iradiere acută, au arătat că rata mutațiilor variază în raport invers cu mărimea genomului (fig. 187), fapt confirmat și de Drake (1969, 1974) (tabelul nr. 30).

Mutațiile joacă un rol continuu și decisiv în evoluția microorganismelor, atât pentru adaptările de durată relativ scurtă, cât și în cursul intervalelor mari de timp. Microorganismele au o rată globală a mutațiilor per genom și per generație remarcabil de constantă, deși prezintă variații de ordinul a 1 000 de ori în mărimea genomului. După Drake (1974), rata mutațiilor spontane ar fi controlată genetic și adaptată la un nivel optim de către forțele evoluției. O rată prea ridicată ar reprezenta o povară pentru specie și ar putea duce la incapacitatea de a produce descendenți viabili. În același timp, o rată prea scăzută ar împiedica emergența de noi variante, necesare pentru a asigura supraviețuirea speciei respective, într-un mediu schimbător. Faptul că cele mai multe mutații sunt nocive reprezintă „prețul” plătit de microorganisme pentru avantajele globale furnizate de mutații pe scara evoluției. În absența mutațiilor, selecția naturală nu ar avea ce prelua și evoluția nu ar avea loc (Drake, 1974).

Teste bacteriene pentru detectarea efectului mutagen și cancerigen al unor substanțe

Utilizarea bacteriilor pentru detectarea efectelor mutagene, potențial cancerigene, sau de inducere a diferite defecte genetice congenitale ale diferitelor substanțe naturale sau de sinteză se bazează pe următoarele argumente: 1) caracterul universal al codului genetic; 2) substanțele care lezează ADN bacterian sunt nocive și pentru ADN uman, fapt care permite utilizarea celulelor bacteriene ca test în locul celor umane; 3) un foarte mare procentaj (~90%) dintre substanțele cancerigene testate sunt mutagene pentru anumite bacterii și cele mai multe substanțe mutagene sunt cancerigene (Ames, 1979); 4) activitatea mutagenă față de bacterii este corelată cu efectul cancerigen pentru mamifere (Devoret, 1979)

Testul lui Ames (1973, 1975)

Utilizează ca tulpină-test o mutantă de *Salmonella typhimurium*, ce are la bază deplasarea cadrului de citire a mesajului genetic și care este incapabilă să facă sinteza histidinei, deci incapabilă să crească pe un mediu de cultură minimal. Reversia la condiția *his*⁺ se face în mod natural rar, dar viteza procesului poate fi foarte mult mărită prin expunere la acțiunea unor agenți mutageni.

Testul lui Ames se bazează pe observația că cele mai multe substanțe chimice (posibil majoritatea) sunt inactivă ca atare și își exercită efectul numai după ce au fost convertite într-o formă activă electrofilă. În mod normal, în organism această conversie se realizează la nivelul ficatului, sub influența sistemelor enzimactice oxidazice cu rol în funcția de detoxicare, prin hidroxilarea compușilor insolubili, pe care îi face excretabili

prin rinichi. În cazul agenților mutageni și cancerigeni, acest proces este nociv pentru că produce metaboliți reactivi care se leagă de ADN. În testul lui Ames, substanțele de cercetat sînt puse în contact cu un omogenizat de ficat de șobolan ca sursă de sisteme enzimatică provenite de la mamifere, de unde și denumirea de *test Salmonella* — *ficat de mamifere* („*Salmonella-mammalian liver test*”).

Testul se efectuează depunînd o rondelă de hîrtie de filtru, în care a fost îmbibată o cantitate cunoscută din substanța de cercetat, pe suprafața unui mediu de cultură minimal gelozat. În prealabil, pe suprafața mediului respectiv a fost etalat, în strat uniform, ~ un miliard de celule dintr-o cultură de *S. typhimurium his⁻*, amestecată cu omogenizat de ficat de șobolan. După două zile, la 37°C, toate bacteriile *his⁻* mor, în timp ce cele care au suferit mutația de reversie *his⁺* (sub acțiunea substanțelor chimice din rondelă) formează colonii vizibile în zona de difuzie a substanței testate (fig. 188 A). Numărul coloniilor dezvoltate per mol de substanță testată exprimă cantitativ puterea mutagenă.

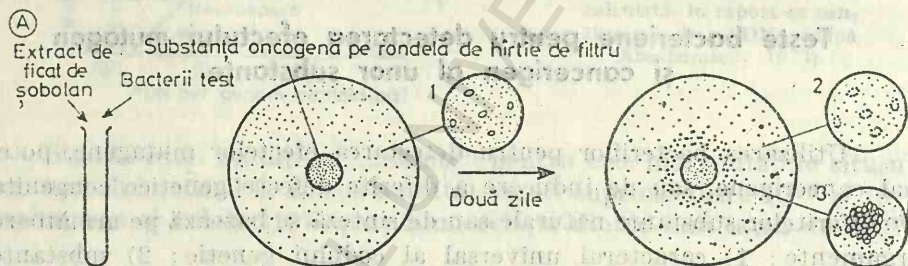


Fig. 188. — A. Detectarea potențialului mutagen cu ajutorul testului Ames. După două zile, cele mai multe bacterii *his⁻* mor din cauza lipsei histidinei. Substanța chimică depusă pe rondela de hîrtie de filtru difuzează în jur și determină mutația de reversie. Bacteriile revertante devin *his⁺* se multiplică, producînd colonii vizibile (3).

Testul Ames este simplu, rapid, necostisitor și cu un grad important de sensibilitate (~ 90% din cazuri, chiar pentru cantități de ordinul nanogramelor). El înlocuiește testele efectuate pe animale, aproape imposibil de realizat în condiții de fiabilitate, datorită lipsei de sensibilitate a tehnicilor actuale, duratei mari a perioadei de observație (2—3 ani), caracterului laborios, prețului ridicat etc. Este evident că un test bacterian nu poate detecta toți produșii cancerigeni și că un produs mutagen pentru *Salmonella* poate fi inofensiv pentru om. În orice caz, o substanță mutagenă pentru bacterii trebuie supusă unor teste mai complicate și mai specifice înainte de a fi folosită la om.

Pentru a mări sensibilitatea testului Ames, au fost introduse, ca tulpini-test, mutante *his⁻* cu defecte genetice multiple (leziuni ale învelișurilor celulare, sensibilitate mare la agenții ce lezează ADN prin eliminarea unor procese de reparație și conținînd o plasmidă care face replicarea mai predispusă la erori). Aceste defecte suplimentare fac bacteriile sensibile chiar la cîteva molecule de substanțe mutagene și cancerigene. Dintre mutațiile numeroase, unele restabilesc caracterul *his⁺*.

Testul de inducție (Inductest) (Moreau și Devoret, 1977)

Utilizează capacitatea substanțelor mutagene și cancerigene de a produce inducția lizei în bacteriile lizogene (Lwoff, 1953).

Testul constă în însămînțarea bacteriilor lizogene, asociate cu extract de ficat de șobolan și cu bacteriile indicatoare (*E. coli*), într-o placă Petri cu geloză, pe suprafața căreia substanța de testat a fost depusă impregnată într-o rondelă de hirtie de filtru. Substanțele mutagene induc trecerea profagului în stadiul de fag vegetativ, replicarea și morfogeneza fagului, care infectează celulele indicatoare, producând formarea de plaje de liză în zona din jurul rondelei, în care a difuzat substanța activă (fig. 188 B).

Inductestul are avantajul că dă răspuns pozitiv chiar la substanțele foarte toxice, care omorâă bacteriile-test (În testul Ames supraviețuiește și poate fi detectată, probabil, numai o singură bacterie, din 1 000 de mutante de reversie (*his*⁺)). Inducția fagului și replicarea lui sint un feno-

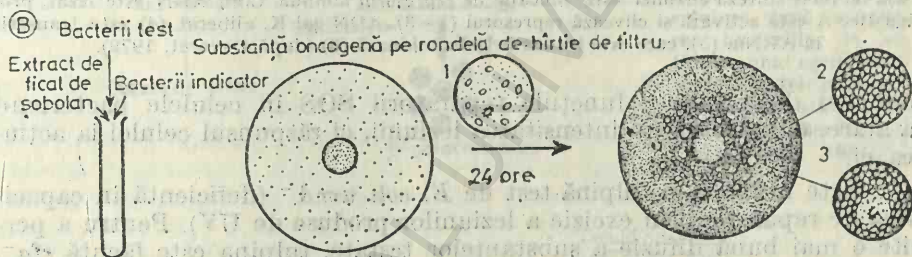


Fig. 188. — B. Inductestul evidențiază capacitatea substanțelor mutagene de a determina inducția litică a profagului lambda și apariția de plaje de liză în jurul rondellei impregnate cu substanța de testat (după Devoret, 1979).

men de masă, care se realizează rapid, în așa fel încît este în mare măsură independent de efectul toxic al substanțelor mutagene (Devoret, 1979).

Testul de inducție enzimatică (Devoret și colab., 1979)!

Utilizează o tulpină bacteriană modificată, la care gena *gal K*, ce codifică enzima galactokinaza, este integrată în geromul profagului λ , în așa fel încît represorul λ blochează sinteza enzimei. Cînd ADN este lezat de un agent chimic, este activată proteina *Rec A*, care clivează represorul λ . ADN *gal K* eliberat în acest fel este transcris la ARNm, care este tradus la galactokinază (fig. 189).

Cantitatea de enzimă care poate fi detectată evidențiază gradul de extindere a leziunii ADN. Acest test este cel mai rapid, deoarece necesită pentru efectuare numai o jumătate de zi.

Cromotestul SOS (Quillardet, Hoffnung și colab., 1982, 1984).

Test enzimatic capabil să detecteze capacitatea genotoxică și eventual oncogenă a diferiților agenți. Testul este bazat pe proprietatea agenților

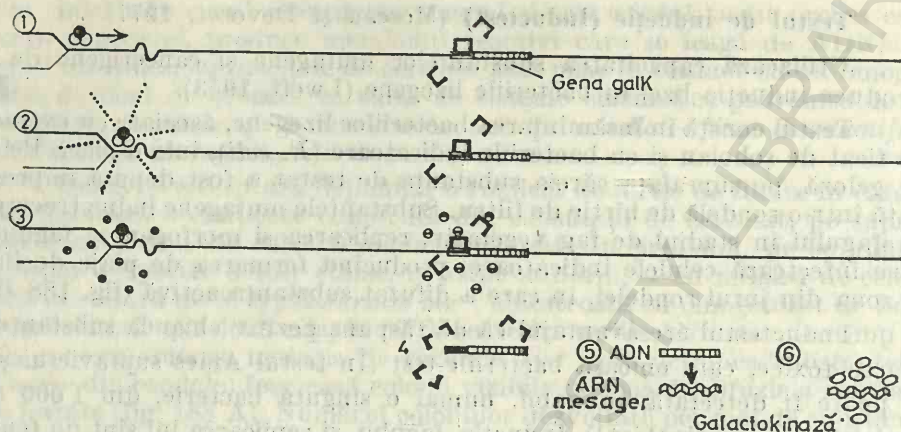


Fig. 189. — Testul de inducție enzimatică, echivalent biochimic al Inductestului, utilizează acțiunea genei *gal K* (necesară pentru sinteza galactokinazei) legată de ADN al profagului λ , în așa fel încât sinteza enzimei este blocată de represorul lambda. Când ADN este lezat, proteina Rec A este activată și clivează represorul (1—3). ADN *gal K*, eliberat (4) este transcris la ARNm (5), care este tradus la galactokinază (6) (după Devoret, 1979).

mutageni de a induce funcțiile reparatorii SOS în celulele bacteriene. Ca atare, el măsoară nu intensitatea leziunii, ci răspunsul celulei la acțiunea ei.

Este utilizată o tulpină-test de *E. coli uvrA⁻* (deficientă în capacitatea de reparație prin excizie a leziunilor produse de UV). Pentru a permite o mai bună difuzie a substanțelor testate, tulpina este făcută *rfa⁻*, respectiv deficientă în sinteza de lipopolizaharide. În plus, la această tulpină s-a realizat o fuziune între gena *ofiA* (una din genele sistemului SOS care inhibă sau blochează diviziunea celulară, George și colab. 1977), și gena structurală *z*, care codifică β -galactozidaza (fig. 190). Datorită deleției unei regiuni normale din operonul *lac*, gena *lac z* este pusă total sub controlul promotorului *ofiA*. În acest mod, cantitatea de β -galactozidază sintetizată reflectă riguros gradul de exprimare al genei *ofiA*, iar aceasta, la rindul său, reflectă capacitatea unui agent genotoxic de a induce funcțiile SOS. Tulpina-test este constitutivă pentru fosfataza alcalină (*Pho^c*), enzimă a cărei concentrație în celula bacteriană reflectă activitatea de biosinteză proteică în general.

Fig. 191 prezintă principiul metodei, bazat pe inducția sistemului reparator SOS. Reacția propriu-zisă este efectuată incubând tulpina-test, cu concentrații progresiv crescînde de substanță activă. După o incubare de două ore se determină colorimetric activitatea β -galactozidazei și a fosfatazei în mediu. Puterea mutagenă a produsului respectiv se exprimă printr-o curbă doză-răspuns, în care rezultatele sînt înregistrate separat și sub forma unui raport β -galactozidază/fosfatază. Gradul de inclinare al curbei respective măsoară puterea unui agent genotoxic de a induce funcțiile SOS și este exprimată ca un indice SOSIP (SOS inducing potency).

Cromotestul SOS are o fidelitate și o sensibilitate comparabile cu tehnicile devenite uzuale, testul lui Ames și Inductestul. Este mai avan-

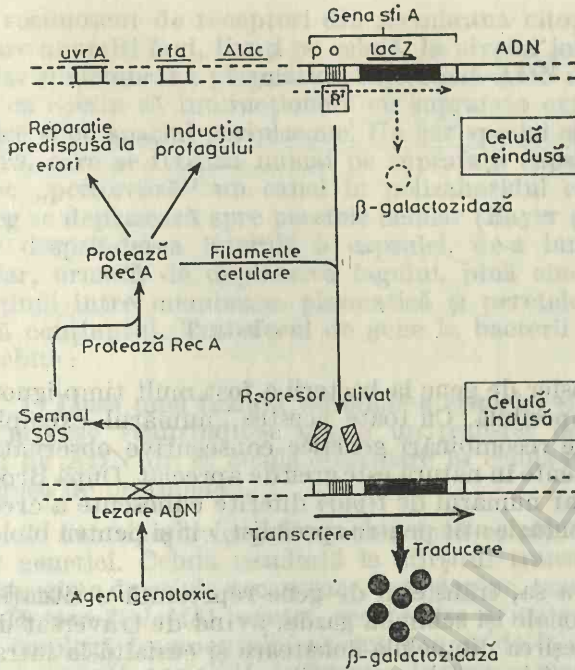


Fig. 190. — Principiul cromotestului SOS. În celula neindusă, represorul *Lex A* împiedică exprimarea fuziunii *Sfi A*: operon *lac Z*; în celula indusă, represorul *Lex A* a fost clivat de proteaza *RecA* activată, fapt care permite inducția exprimării genelor *Sfi A* — *lac Z* (după Quillardet și Hoffnung, 1984).

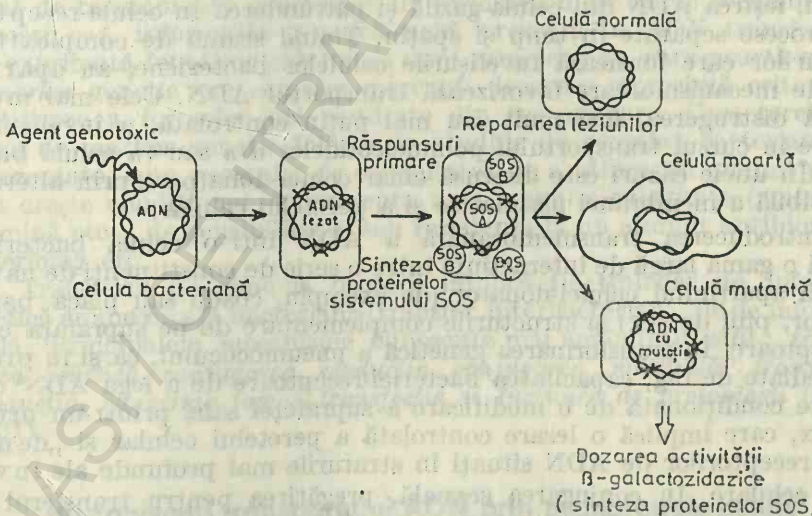


Fig. 191. — Relația dintre evenimentele celulare după expunerea bacteriilor la acțiunea unui agent genotoxic și datele măsurate în cromotestul SOS (după Quillardet și Hoffnung, 1984).

tajos decît acestea prin faptul că este mai ușor de efectuat, prin determinarea colorimetrică a activității enzimaticе, mai rapid (cîteva ore) și nu este condiționat de supraviețuirea tulpinii-test (Quillardet, Hoffnung și colab., 1984).

Transferul de gene la bacterii

Existența unui transfer de gene la bacterii a fost mult timp ignorată și chiar considerată ca imposibilă. Cu toate acestea, numărul exemplelor de transfer de gene și de recombinări genetice consecutive observate în laborator și probabil existente în natură este greu de apreciat. După Brooks-Low și Porter (1978), chiar numărul de *tipuri* diferite cunoscute a crescut la un nivel care creează confuzie atît pentru specialist, cit și pentru biologia generală.

Indiferent de natura sa, transferul de gene reprezintă o situație în care moleculele informaționale își schimbă gazda, avînd de traversat două bariere celulare: una la ieșirea din celula-donatoare și cealaltă la intrarea în celula-receptoare. Numai în cazul conjugării acest proces este corelat. În transformarea genetică sau în procesele de transfer de gene mediate de fagi, ieșirea ADN din celula-gază și pătrunderea în celula-receptoare sînt procese separate în timp și spațiu. Ținînd seama de complexitatea structurilor care formează învelișurile celulelor bacteriene, au apărut o serie de mecanisme care favorizează transportul ADN. Cele mai multe, implică distrugerea, mai mult sau mai puțin controlată, a învelișurilor celulare în cursul transportului polinucleotidelor din sau în celula bacteriană. În unele cazuri este distrusă chiar celula-donatoare prin alterarea ireversibilă a membranei plasmatice și a peretelui celular.

Introducerea transmembranară a ADN într-o celulă bacteriană implică o gamă largă de interacțiuni între o serie de constituenți de natură proteică aparținînd celulei-donator (de exemplu, coada sau placa bazală a fagilor, pili de sex) și structurile complementare de pe suprafața celulei-receptoare. În transformarea genetică a pneumococului, ca și în procesele mediate de fag, capacitatea bacteriei-receptoare de a lega ADN exogen este condiționată de o modificare a suprafeței sale, printr-un proces complex, care implică o lezare controlată a peretelui celular și „demascarea” receptorilor de ADN situați în straturile mai profunde ale învelișurilor celulare. În conjugarea sexuală, pregătirea pentru transferul de gene este un proces complicat, realizat de producția a 32 de gene (Achtman, 1977), care asigură apropierea spațială a celor două celule ce vor forma cuplul de conjugare și juxtapunerea exactă a situsurilor donator și receptor. În unele cazuri de transfecție sau de transducție genetică, transportul ADN este „asistat” de proteine specifice „pilot”, care dirijează depășirea transmembranară a polinucleotidului. Deși, cel mai adesea, ADN

este recunoscut de receptori din membrana citoplasmatică, există cazuri în care anumiți fagi, fixați pe celulă, la nivelul joncțiunilor dintre peretele celular și membrana plasmatică, injectează ADN direct prin coada extinsă, fără ca acesta să interacționeze cu suprafața externă a membranei plasmatică și cu spațiul periplasmic. Un caz special este oferit de fagul *E. coli* K-29, care se fixează numai pe suprafața capsulei, după care enzimele fagice „perforează” un canal în polizaharidul capsular, prin care fagul întreg se deplasează spre peretele celular (Bayer și Thurow, 1977). El produce desprinderea laterală a capsulei, de-a lungul suprafeței peretelui celular, urmată de deplasarea fagului, pînă cînd ajunge la nivelul unei joncțiuni între membrana plasmatică și peretele celular, unde își injectează conținutul. Transferul de gene la bacterii are unele particularități deosebite :

1) Lipsa unei fuziuni veritabile a celulelor și nucleilor, în cursul acestor procese realizîndu-se numai un transfer unidirecțional al fragmentului de ADN de la celula-donatoare la celula-receptoare. Face excepție fuziunea de protoplaști.

2) Contribuția inegală a celor două celule la formarea recombinanților genetici. Celula rezultată la sfîrșitul transferului este reprezentată în întregime de celula-receptoare, care devine, temporar și parțial, diploidă (celulă merodiploidă), pentru acea parte a materialului său genetic, care este omologă fragmentului exogen primit de la donator. În unele cazuri, cu o frecvență variabilă, în funcție de natura modului de transfer, a ADN transferat și a celui rezident în celula-receptoare, transferul de gene este urmat de recombinare genetică și de formarea unor celule recombinante. În acest caz, informația genetică nouă prezentă în ADN transformant este exprimată fenotipic sub forma unui caracter nou, care poartă numele de marker genetic sau caracter marcant, deoarece reprezintă criteriul de identificare a formelor noi rezultate din recombinare. Caracterele noi, cu rol de marker genetic folosite în studiile de genetică bacteriană sînt reprezentate, spre exemplu, de capacitatea de a utiliza un anumit glucid, de a crește condiționat de prezența unei anumite substanțe (aminoacid, vitamină etc.), de sensibilitatea sau rezistența la un anumit antibiotic sau bacteriofag etc.

Transferul de gene la bacterii implică fie transfer de informație genetică cromosomală bacteriană (transfer interbacterian), fie de informație virală. Principalele mecanisme cunoscute mai amănunțit sînt : transformarea genetică, conjugarea, sexducția, conjugarea „micelială”, transducția, capsducția, conversia fagică, transfecția și fuziunea de protoplaști (tabelul nr. 31).

Mecanismul transportului ADN prin membranele celulei bacteriene

Deși foarte mult studiat, mecanismul transportului ADN prin membranele bacteriene este încă puțin cunoscut. Pe baza unor date experimentale, au fost emise mai multe ipoteze contradictorii, care nu au fost verificate în practică.

Tabelul nr. 31

Modalități de transfer de material genetic la bacterii

Modul de transfer	Sistemul implicat	Intermediarul transferului	Originea materialului genetic	Particularități evidențiate
I. TRANSFORMARE GENETICĂ				
A. Competență fiziologică	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ADN d.c.	Cromosom bacterian	Fragment m.c. 7-8 kb
	<i>Bacillus subtilis</i>	ADN d.c.	Cromosom bacterian	Fragment 7,5-9 kb
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ADN d.c.	Plasmide	
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	ADN d.c.	Plasmide	
B. Competență artificială	<i>Escherichia coli</i>	ADN d.c.	Cromosom bacterian	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ADN d.c.	Cromosom bacterian Plasmide	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ADN d.c.	Plasmide	
II. CONJUGARE				
Plasmide de sex (conjugon)	Plasmide F, R, Col la diferite tulpini de <i>Acinetobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Vibrio</i>	ADN m.c.	Plasmide Cromosom bacterian (după mobilizarea unei plasmide de sex de integrate, Hfr)	Eficiență de transfer cu spectru larg Frecvență mare de transfer al markerilor cromosomali
III. CONJUGARE MICELIALĂ				
	<i>Streptomyces</i> sp., <i>Nocardia</i> , <i>Microspora</i> , <i>Mycobacterium</i> Plasmidele SCP1 și SCP1-prim la <i>S. coelicolor</i>	ADN m.c.	Gene cromosomale Plasmide	
IV. SEXDUCTIE				
	Plasmida F'	ADN m.c.	Plasmida F + gene cromosomale	Transfer plasmida F'
V. TRANSDUCTIE FAGICĂ				
A. Specializată	λ — <i>E. coli</i>	Particule fagice purtând genôm hibrid fagobacterian Capsidă fagică, ADN bacterian	Cromosom bacterian lizogen	Unii virioni defectivi
B. Generalizată	Φ 80 — <i>E. coli</i>			
	P 22 — <i>Salmonella typhimurium</i> P1 — <i>E. coli</i>		ADN cromosomal	ADN d.c.
VI. CAPSDUCTIE				
	<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Agentul de transfer al genelor	ADN d. c. bacterian	

Tabelul nr. 31 (continuare)

Modul de transfer	Sistemul implicat	Intermediarul transferului	Originea materialului genetic	Particularități evidențiate
VII. CONVER-SIA FAGICĂ	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Clostridium tetani</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Salmonella anatum</i>	Fag în cultură bacteriană	ADN fagic	
VIII. TRANS-FER DE GE-NE ASOCIAT CU FAGUL	<i>S. pneumoniae</i>	Particulă asociată cu fagul	Cromosom bacterian	
IX. FUZIU-NE DE PRO-TOPLASTI	<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>S. coelicolor</i>	Cromosom complet	Cromosom	
X. TRANS-FECȚIA				
A) „ajutată”	<i>E. coli</i> /ADN λ	ADN fagic	ADN fagic	
B) prin șoc cu Ca^{2+}	<i>E. coli</i> /ADN și P2	ADN fagic	ADN fagic	
C) sferoplaști	<i>E. coli</i> /ADN T1, T3, T par Φ X 174, P2 ARNMS2	ADN fagic	ADN fagic	
D) competență fiziologică	<i>Bacillus subtilis</i> /ADN Polioma-virus și Poxvirus	ADN fagic sau din virusuri ani-male	ADN fagic sau din virusuri animale	

1) Injectarea ADN fagic, propusă de Zabrynicky (1969), pe baza capacității fagilor din seria T-par de a elibera ADN în mediul înconjurător, după contactul cu receptori izolați din peretele celular, se face în ~15 sec., ceea ce sugerează participarea unor forțe de propulsie foarte puternice, încă necunoscute, care ar asigura „împingerea” ADN prin coada fagului în celula bacteriană. Este, probabil, că împachetarea ADN într-o formă foarte pliată și strânsă l-ar pune sub o presiune considerabilă (Stent, 1956), căreia i s-ar adăuga presiunea produsă de agitația termică a moleculelor mari (poliamine, polipeptide, proteina internă) în interiorul capului fagic (Zabrinicky, 1973).

În unele cazuri (fagul *B. subtilis*), deplasarea transmembranară a ADN fagic ar fi controlată de interacțiunea dintre anumite proteine-pilot și receptori membranari (Tomasz, 1978). Spre deosebire de aceștia, fagul T5 eliberează, cel puțin parțial, ADN din capsidă, după adsorbția sa ireversibilă pe receptorul specific din peretele celular. Molecula de ADN rămâne o perioadă de timp atașată de suprafața celulei, înainte ca un prim segment din ea să pătrundă în citoplasma bacteriană. În acest ultim caz, mecanismul de pătrundere al ADN fagic este greu de conciliat cu ipoteza „injectării” în celula bacteriană (Labendan, 1976).

2) **Transferul asociat cu replicarea ADN.** După Jacob, Brenner și Cuzin (1963), în cursul conjugării bacteriene, transferul ADN ar fi asociat cu replicarea sa. Una din catenele moleculei de ADN este incizată și transferată în celula-receptoare, începînd cu extremitatea sa 5'. Transferul începe și progresează pe măsură ce ADN polimeraza reface, în celula-donatoare, structura dublu helicală a plasmidei sau a cromosomului, folosind ca matriță catena rămasă intactă. În felul acesta, replicarea ADN în celula-donatoare furnizează forța de propulsie care asigură transferul progresiv al catenei incizate. La rîndul său, aceasta servește ca matriță, în celula-receptoare, pentru sinteza unei copii complementare. În cazul transferului de plasmide F, spre exemplu, prin acest mecanism, celula-donatoare își reface structura genetică inițială (F^+), iar celula-receptoare (F^-), devenită F^+ , va conține o plasmidă formată dintr-o catenă sintetizată anterior conjugării (provenită de la donator) și alta sintetizată în cursul transferului.

Un mecanism similar a fost sugerat și în transformarea genetică, pornind de la observația că ADN exogen monocatenar este replicat în celula-gază. Există însă date care demonstrează că transferul ADN poate avea loc și în absența replicării sale în celula-donatoare sau receptoare. De altfel, Bouck și Adelberg (1966) au sugerat că replicarea genomului în bacteriile Hfr ar avea loc integral în celula-donator, iar transferul în celula F^- s-ar realiza numai după ce replicarea cromosomului s-a încheiat, atunci cînd în celula Hfr există, pe lângă propriul său cromosom, și o copie a acestuia care poate fi transferată.

3) **Transportul facilitat de DNaze.** Lacks și Greenberg (1976) consideră că în primele stadii ale transformării genetice, transportul ADN m.c. ar fi catalizat de o DNază legată de membrană, care formează un cilindru proteic multimer transmembranar, ca un canal. ADN ar trece în formă monocatenară, deoarece DNaza ar degrada catena opusă în cursul transferului, furnizînd astfel forța motrice a transportului. Ipoteza nu a fost probată experimental, la nici una din bacteriile susceptibile de transformare genetică.

4) **Transportul ADN asociat cu liza peretelui celular.** După Akrigg și colab. (1969), transportul ADN ar fi asociat cu liza unor secțiuni ale peretelui celular bacterian, urmată de ieșirea veziculelor mezosomale prin „găurile” rezultate și legarea moleculelor de ADN din mediu. În acest fel, ADN exogen ar fi adus în contact strîns cu punctul de inițiere a replicării ADN celular, care ar fi localizat în mezosom. Energia necesară pentru transferul ADN ar fi furnizată de enzimele lanțului respirator sau de alt mecanism energetic celular, necunoscut.

5) **Transportul ADN facilitat de proteine.** Marco și colab. (1974) au observat că în cazul anumitor fagi, atât ADN, cît și unele proteine fagice sînt transportate în celula bacteriană în cantități ~ echimoleculare și cu o cinetică similară de pătrundere. Pe baza acestor date, Kornberg (1974, 1977) sugerează că proteina de înveliș a anumitor fagi ar putea facilita transportul ADN prin membrana celulară, formînd un por transmembranar. Mecanismul ar funcționa și în transportul conjugativ al ADN, de la donator la receptor, cu participarea unei proteine similare.

6) **Transportul acizilor nucleici virali** este variabil în funcție de natura celulei-gazdă. În cazul celulelor vegetale, el implică existența obligatorie a unei leziuni mecanice a peretelui celulozic, în timp ce în cazul celulelor animale se realizează prin *endocitoză (viropexie)* și/sau *fuziune* între membrana celulară și învelișul extern al particulei virale.

7) **Transportul transmembranar al ADN dirijat de gradientul ionic.** Grinius (1976, 1980) a formulat un concept unificator, care încearcă să explice transportul transmembranar al acizilor nucleici, în toate tipurile de celule, avind ca forță motrice gradientul ionic. Ipoteza are la bază principiile teoriei chemiosmotice, formulată de Mitchell (1961, 1970) *. Ea pornește de la ideea că existența unui „canal” permanent transmembranar suficient de mare pentru a permite trecerea ADN este incompatibilă cu datele experimentale, care demonstrează o mare rezistență electrică a membranei plasmatică. În acest caz, se impune ideea formării unui „canal” deschis în cursul interacțiunii unei molecule de ADN cu membrana, care este închis sau distrus după înglobarea acestuia.

Unele observații făcute de Raina și colab. (1979), la *Streptococcus sanguineus* sugerează posibilitatea transportului ADN sub forma unor complexe nucleoproteice. Astfel, s-a demonstrat că în primele stadii ale transformării genetice, una din catenele ADN d.c. este degradată, în timp ce cealaltă este complexată cu o proteină bacteriană. Inițial complexul este localizat subparietal (în afara membranei plasmatică), deoarece poate fi eliberat cu ajutorul tehnicilor de formare a protoplaștilor. Într-o fază următoare însă, el este găsit în celulă.

După Grinius (1980), transferul ADN m.c. sau d.c. (fig. 192) s-ar realiza în următoarele etape:

1) Polinucleotidul formează cu proteinele bazice un complex încărcat pozitiv, pe suprafața externă a membranelor celulare, prin legarea de H^+ (în cazul celulelor bacteriene) sau de Na^+ (în cel al celulelor animale).

2) Interacțiunea complexului polinucleotid-poli-peptidic cu membrana celulară are loc la nivelul unui situs în care structura stratului dublu fosfolipidic este temporar întreruptă de cimpul electric transmembranar. Interacțiunea determină rearanjarea stratului dublu fosfolipidic și formarea temporară a unui canal transmembranar.

3) Datorită diferenței de potențial electrochimic prin membrană, complexul polinucleotid-poli-peptidic pătrunde în „canalul” membranal linear și se deplasează spre suprafața internă a membranei, unde eliberează, după caz, fie H^+ , fie Na^+ .

Particularitățile fundamentale ale acestui mecanism sînt următoarele: 1) sistemul de transport transmembranar al ADN nu preexistă, ci se formează după interacțiunea cu ADN, unii cofactori și fosfolipide și durează pînă la sfîrșitul transportului; 2) înglobarea moleculei polianionice de ADN, în celula bacteriană sau animală, este cuplată cu influxul de H^+ și respectiv de Na^+ și 3) fluxul acestor ioni este dirijat de potențialul de membrană și/sau de concentrația transmembranară a gradientului ionic.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 124.

În favoarea acestui mecanism pledează o serie de fapte de observație, ca : 1) sensibilitatea procesului de înglobare a moleculelor de ADN la decuplanți ai fosforilării oxidative și la antibiotice ionofore ; 2) izolarea

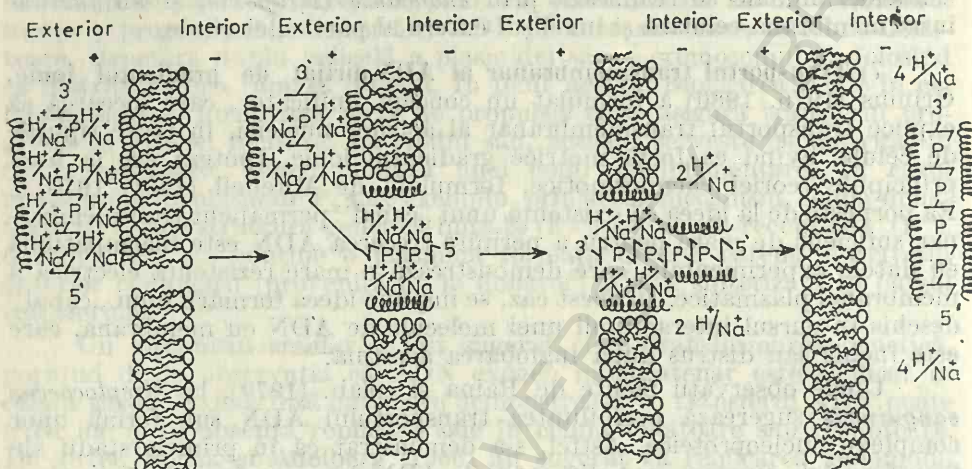


Fig. 192. — Modelul lui Grinius (1980) privind transportul transmembranar al acizilor nucleici, sub influența unui gradient ionic.

de proteine specifice de legare a ADN (Sisco și Smith, 1978) și 3) stimularea incorporării de ADN de către celulele animale, ca și de protoplastii bacterieni și vegetali, în prezența polipeptidelor bazice exogene (Berzinskiene și colab., 1980).

Transformarea genetică

Transformarea genetică este consecința transferului de informație genetică, realizat prin intermediul unui fragment din ADN total al bacteriei donator, eliberat prin extracție chimică sau prin liza celulei. Odată pătruns într-o celulă-receptoare, fragmentul de ADN exogen poate înlocui printr-un proces de recombinare genetică o secvență nucleotidică omologă din genomul receptorului. Dacă segmentul astfel integrat diferă de cel înlocuit, celula-receptoare va dobîndi o proprietate nouă, controlată de o secvență nucleotidică exogenă, incorporată în genomul ei. Prin procesul de transformare genetică, anumite tulpini bacteriene crescute în prezența unor celule omorîte și lizate, a unor filtrate de cultură sau a unor extracte de ADN provenind de la tulpini înrudite pot, prin urmare, să capete și să manifeste în generațiile următoare anumite proprietăți noi, caracteristice tulpinii-donatoare de ADN transformant.

Descrisă inițial la pneumococ (*Streptococcus pneumoniae*), transformarea genetică a fost pusă în evidență la cel puțin 17 specii din genurile *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Acinetobacter* etc. Pe lângă transformarea genetică homospecifică au fost descrise numeroase cazuri de transfer heterospecific, ca, de exemplu, *Haemophilus influenzae* \rightleftharpoons *H. parainfluenzae*, *Bacillus subtilis* \rightarrow *B. niger*, *B. polymyxa*, *B. globigii*, *B. licheniformis* sau *Pseudomonas fluorescens* \rightarrow *Ps. aeruginosa*, *Ps. solanacearum*. Au fost obținute, de asemenea, transformări genetice intergenice, ca, de exemplu, *Neisseria* \rightarrow *Moraxella* sau *Micrococcus lysodeikticus* \rightarrow *Sarcina*, *Staphylococcus* etc.

Descoperirea transformării genetice. Fenomenul a fost descoperit în 1928, de Griffith, cu ocazia studiilor asupra variabilității la pneumococ, specie care poate fi subîmpărțită în ~80 de tipuri distincte, pe baza compoziției chimice și a specificității serologice a polizaharizilor capsulari. Spre exemplu, polizaharizii capsulari de tip III sînt polimeri de glucoză și acid glucuronic, iar cei de tip II, polimeri de acid galacturonic, galactoză, N-acetil-glucozamină și fucoză. Sinteza polizaharizilor specifici de tip necesită prezența și intervenția unor enzime (polimeraze) adecvate și, în consecință, a unui echipament genetic corespunzător, capabil să determine sinteza acestor enzime. De prezența capsulei polizaharidice, capabilă să protejeze bacteria de fagocitoză, depinde virulența diferită a tipurilor de pneumococ, precum și dezvoltarea lor în culturi sub forma variantelor „S” („smooth”).

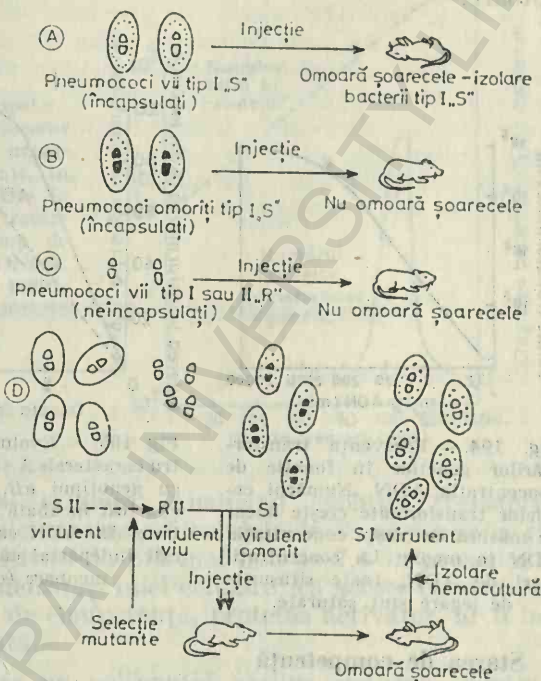
Griffith a demonstrat că apariția tulpinilor variante necapsulate și avirulente („R”), mai mult sau mai puțin stabile, poate fi indusă prin cultivarea pneumococilor capsulați în prezența antiserului specific de tip. Mutantele acapsulate pot suferi retromutații de la „R” la „S”, cu recăpătarea proprietăților inițiale, cu o frecvență mult mai mică decât mutația $S \rightarrow R$. Deoarece tipul antigenic reprezintă un caracter controlat genetic, niciodată o tulpină „S” sau „R” de un anumit tip antigenic nu se schimbă prin mutație într-o tulpină „R” sau „S” aparținând unui alt tip. Studiind stabilitatea variantelor avirulente, Griffith a observat însă că, uneori, cînd sînt inoculate în doze mari, chiar bacteriile necapsulate, deci avirulente, pot produce infecții mortale la șoarece, de la care se izolează însă bacterii capsulate, virulente. El a presupus că bacteriile avirulente nu și pierduseră complet capacitatea de sinteză a polizaharidului capsular și că, prin inocularea unui număr mare de bacterii s-ar introduce o cantitate suficient de ridicată de polizaharid pentru ca, într-un mod necunoscut, capacitatea normală de sinteză a capsulei să se restabilească la aceste bacterii. Conform ipotezei sale, tulpinile necapsulate și-ar putea recăpăta astfel virulența în contact cu polizaharidul capsular. Pentru a-și verifica experimental ipoteza, conform căreia celulele stabil necapsulate își pot recăpăta capsula și virulența dacă li se pune la dispoziție material capsular exogen, Griffith a inoculat pe cale subcutanată la șoareci un amestec alcătuit dintr-un număr mic de bacterii vii virulente (bacterii necapsulate de tipul serologic II) și o cantitate mare de bacterii virulente (capsulate, de tip III), omorite prin căldură. Inoculate separat, nici una dintre cele două componente ale amestecului nu sînt infectate. Asociate însă, ele omoră șoarecii prin septicemie, din singele animalelor infectate izolîndu-se pneumococi capsulați de tip III* (fig. 193). Transformarea a fost ulterior demonstrată cu același sistem și *in vitro* (Dawson și Sia, 1931); precum și în prezența unor extracte aceluare de pneumococ virulent capsulat de tip III.

Alloway (1933) a arătat că principiul activ al transformării genetice este prezent în extractele aceluare. Natura agentului transformant care opera în experiențele lui Griffith a fost demonstrată însă abia în 1944, de Avery, MacLeod și McCarty, care au arătat că el constă într-un fragment de ADN pur, cu grad înalt de polimerizare. Reevaluată în lumina cunoștințelor ulterioare relative la capacitatea transformantă a ADN, transformarea pneumococului observată de Griffith se explică prin aceea că aportul de material genetic aparținînd pneumococilor capsulați de tip III înzestrează celulele necapsulate de tip II cu determinanții genetici ai căilor metabolice de sinteză a polizaharizilor capsulari de tip III. În mod similar, pot fi transmiși, de altfel, și alți determinanți genetici, cum ar fi aceia care conferă unor celule bacteriene rezistența la un antibiotic sau

* Transformarea apare cel mai frecvent cînd bacteriile avirulente au același tip de polizaharid capsular ca și bacteriile omorite, transformante. Utilizînd bacterii cu alt tip de polizaharid capsular ca „marker” genetic pentru confirmarea ipotezei sale, Griffith a demonstrat că pneumococii avirulenți avînd originar un anumit tip de capsulă (spre ex. II) pot fi transformați stabil în oricare alt tip (spre ex. I, III ș.a.m.d.), corespunzînd tipului capsular al bacteriilor omorite, în asociere cu care au fost inoculate la șoarece.

capacitatea de sinteză a unei enzime implicate în anabolismul sau catabolismul celular. Fiecare dintre noile caractere dobândite de celulele competente reprezintă un „marker”, adică o însușire specifică în funcție de care pot fi izolate pe medii selectivă numai acele celule care au suferit transformarea în sensul respectiv.

Fig. 193. — Experiența de transformare a pneumococilor efectuată de Griffith. A, B, C. Teste de control al virulenței pentru șoarece a tulpinilor de *Streptococcus pneumoniae* utilizate. D. Inoculate împreună cu celule „S” virulente de tip I, omorite prin căldură, celulele mutante „R” avirulente de tip II sint transformate în celule virulente „S” de tip I, sub acțiunea ADN eliberat de celulele bacteriene omorite.



Caracteristicile ADN transformant

Capacitatea ADN de a pătrunde în celulele competente este dependentă de cel puțin două proprietăți fizice: 1) structura dublu catenară și 2) mărimea moleculelor. Moleculele de ADN natural, dublu catenar, au o activitate transformantă maximă, care este diminuată prin alterarea sau modificarea structurii lor. ADN monocatenar are o activitate transformantă foarte mică sau cel mai adesea nulă. Atât la pneumococ, cât și la *B. subtilis*, activitatea transformantă este condiționată de o dimensiune minimă a ADN de la donator, apreciată de Schwartz (1975) la $\sim 1 \times 10^6$ dal. Nu se cunosc bazele moleculare ale acestei necesități pentru o dimensiune minimă. La valori superioare, numărul celulelor transformate crește rapid, paralel cu creșterea lungimii ADN donator.

Experimental, rezultatele cele mai bune se obțin cu fragmente avind, în general, g.m. $\sim 5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$. Cu precauții speciale se pot realiza transformări cu fragmente mai mari ($\sim 5 \times 10^8$ sau chiar peste). Frecvența transformărilor genetice este influențată de concentrația ADN în mediu. După Brock (1974), concentrația minimă de ADN care produce o transformare genetică detectabilă este de $\sim 1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$, ceea ce

corespunde unor cantități nedetectabile cu metodele chimice actuale. Numărul celulelor transformate crește paralel cu creșterea concentrației ADN în mediu, (pentru ca la concentrații mari să rămână în platou) (fig. 194, 195), datorită faptului că toate situsurile de legare a ADN sînt saturate) și cu durata perioadei de contact a ADN transformant cu bacteriile receptoare.

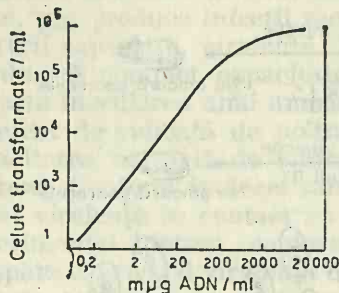


Fig. 194. — Frecvența transformărilor genetice în funcție de concentrația ADN. Numărul celulelor transformate crește linear pe măsură ce crește concentrația ADN în mediu. La concentrații mari de ADN, toate situsurile de legare sînt saturate.

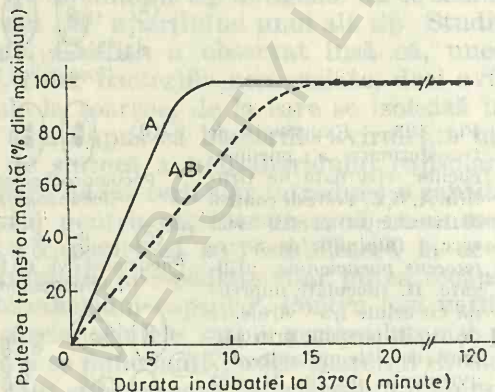


Fig. 195. — Evoluția puterii transformante pentru caracterele A și AB ale ADN dintr-o bacterie cu genotipul *aB*, la diferite intervale, după cea fost incubată cu ADN extras dintr-o bacterie *Ab*. ADN care nu a pătruns în celule este îndepărtat cu DNază și spălare înainte de incubare (după Schwartz, 1975).

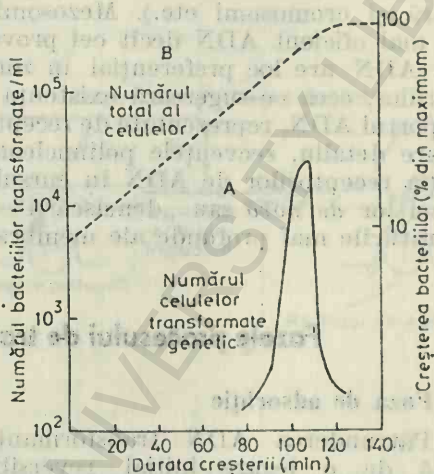
Starea de competență

Transformarea genetică este posibilă numai dacă bacteriile receptoare prezintă o stare de competență, care le permite interacțiunea cu un fragment de ADN exogen, facilitind înglobarea ireversibilă a acestuia. Competența este o stare fiziologică tranzitorie, care variază mult în cursul diferitelor faze ale ciclului de multiplicare celulară. La *S. pneumoniae*, ea are o evoluție scurtă, cînd crește foarte mult, în mijlocul fazei exponențiale, după care scade rapid. În momentul cînd competența este maximă, virtual toate celulele din mediu sînt apte să înglobeze ADN exogen (fig. 196).

Competența este asociată cu începutul fazei exponențiale la *Rhizobium* și cu sfîrșitul ei la *Haemophilus* și *B. subtilis*. Durata perioadei maxime este de ~ 15 min (Thomas, 1955). Este controlată genetic și poate fi anulată prin mutație („mutante de competență”). Poate fi indusă prin transferul celulelor cultivate dintr-un mediu de cultură relativ bogat în nutrienți, într-un mediu sărac (transfer „shift-down”). În aceste condiții, ~ 15% din celulele de *B. subtilis* și ~ 100% de *S. pneumoniae* devin competente. Apariția competenței durează cîteva minute și este stimulată sau inhibată de prezența, respectiv de absența unor aminoacizi (ca arginina și acidul glutamic). După Birge (1981), celulele competente au pe suprafață un antigen diferit, numit *factorul de competență*, reprezentat de un

polipeptid cu g.m. mică, ce poate fi îndepărtat prin spălare sau tratare cu tripsină. Adăugat în mediile cu celule incompetente, s-ar fixa pe suprafața unor antigene specifice normale de suprafață și ar iniția un lanț de reacții care induce starea de competență, numită „activarea de la exterior” („activation from without”, Tomasz, 1973).

Fig. 196. — Apariția competenței într-o cultură de *Streptococcus pneumoniae*. A. Evoluția numărului de celule transformate, în probe de cultură, recoltate la diferite intervale, după tratare cu ADN transformant, timp de câteva minute, apoi cu DNază. B. Curba indică dinamica multiplicării bacteriilor (după Schwartz 1975).



Expresia competenței celulare. Analizând evoluția transformării genetice, Tomasz (1978) a demonstrat că celulele de *S. pneumoniae* rămân incompetente dacă sint cultivate la pH mai mic de 7,4 în prezența unor enzime proteolitice sau la densități mici celulare. În aceste condiții, agentul inductor-cheie al stării de competență, proteina activator, ar fi inactivată sau nu ar fi sintetizată.

Proteina activator este un polipeptid produs endogen, relativ mic ($M \sim 8-10 \times 10^3$), cationic, bogat în aminoacizi bazici și hidrofobi, sensibil la enzime proteolitice și extrem de aderent de toate suprafețele. Starea de competență se instalează cînd proteina activator se leagă de receptorul său prezumtiv, *proteina inhibitoare a activatorului* (PIA). Aceasta este o proteină membranară extrinsecă, termolabilă, cu masa moleculară $\sim 68\,000$ dal. Se apreciază că ar exista $\sim 3\,000-5\,000$ molecule PIA/celulă (Tomasz, 1978). Apariția competenței este un fenomen complex, care implică sinteza de proteine *de novo*, existența unei zone de creștere a peretelui celular, prezența unei mureîn hidrolaze active și a unui perete celular sensibil la hidrolaze. Cînd toate aceste condiții sint realizate, adăugarea activatorului are drept rezultat conversia rapidă a tuturor celulelor incompetente la competență. După activare, celulele modificate prezintă pe suprafață un antigen nou — *antigenul de competență*.

Starea de competență este legată, cel puțin parțial, de modificări importante ale peretelui celular bacterian. Proteina activator inițiază o serie de alterări de suprafață prin acțiunea mureîn hidrolazei, la zona de creștere a peretelui celular, care duc la „demascarea” receptorilor de ADN. Rolul normal, fiziologic, al acestei enzime este de a acționa la sfîrșitul diviziunii celulare, pentru separarea fizică a celulelor-surori. Celulele com-

petente au peretele celular mai poros și cu o suprafață intens electro pozitivă, ceea ce favorizează legarea fragmentelor de ADN, încărcate electro negativ. Totodată, apar modificări ultrastructurale la nivelul mezosomilor, sugerind posibilitatea acestora de a acționa ca un mecanism de transport (creșterea numărului lor, dezvoltarea legăturii dintre suprafața celulară și cromosomi etc.). Mezosomii izolați din celulele competente leagă mai eficient ADN decât cei proveniți din celule incompetente. Legarea ADN are loc preferențial în zona ecuatorială sau la extremitățile bacteriilor, ceea ce sugerează existența unor structuri subcelulare pentru transportul ADN, reprezentate de receptori specifici capabili să recunoască, în mare detaliu, secvențele polinucleotidice. Nu se știe însă exact dacă apariția receptorilor de ADN în cursul stării de competență corespunde sintezei lor *de novo* sau „demascării” unor receptori preexistenți, legați de straturile mai profunde ale membranelor celulare.

Fazele procesului de transformare genetică

Faza de adsorbție

Pătrunderea ADN transformant în celula bacteriană este precedată de o legare inițial reversibilă, scurtă (uneori de numai 1—5 secunde), când acesta poate fi îndepărtat prin spălare intensă sau cu DNază. Siturile receptoare de polinucleotide nu deosebesc ADN propriu de cel al altor specii, astfel încât o bacterie leagă orice specie de ADN d.e., deși numai cel aparținând aceleiași specii sau cu un grad important de omologie are activitate transformantă. În plus, ADN străin (chiar de proveniență animală) poate intra în competiție cu cel bacterian cărui i se poate substitui, dacă predomină cantitativ. Face excepție *Haemophilus influenzae*, al cărui receptor recunoște detalii foarte mari din structura polinucleotidelor și, probabil, chiar anumite secvențe specifice.

Fixarea reversibilă este urmată de o fază de fixare ireversibilă, în cursul căreia, probabil, ADN transformant nu mai este intracelular, ci se găsește cel puțin parțial în spațiul periplasmic, fapt care ar explica rezistența sa la DNază. Adsorbția se realizează optim la 30°C și la o găină largă de valori de pH. Numărul situsurilor de legare este variabil, putând oscila între 2—10 la *Haemophilus* și 30—80 la *S. pneumoniae*. Hamilton—Smith și colab. (1980) au identificat secvențe specifice de baze în moleculele de ADN care sînt „recunoscute”, adsorbite și înglobate de *H. influenzae* după recunoașterea lor de una sau mai multe proteine de suprafață. Legarea ireversibilă necesită consum de energie, de aceea nu se realizează la bacteriile cu metabolism energetic inhibat. Datorită acestui fapt, în absența glucozei are loc numai o fixare labilă (de suprafață) a ADN, în timp ce în prezența ei, majoritatea moleculelor se leagă solid de membrana plasmatică, ADN absorbit rămîine fixat de protoplaști după îndepărtarea peretelui celular („legarea profundă”; engl. „deep binding”) (fig. 197), datorită prezenței unei proteine de legare. Deși peretele celular are un rol de barieră, el pare să fie esențial în adsorbție pentru stabilizarea moleculelor de ADN pe suprafața bacteriei. Dovada o constituie faptul că protoplaștii bacteriilor competente leagă foarte slab ADN trans-

formant. Este probabil că, unele leziuni limitate ale peretelui celular sub forma unui tunel cu formă corespunzătoare ar permite grupărilor chimice din lumenul tunelului să contribuie la menținerea ADN legat de receptorul specific nemascat.

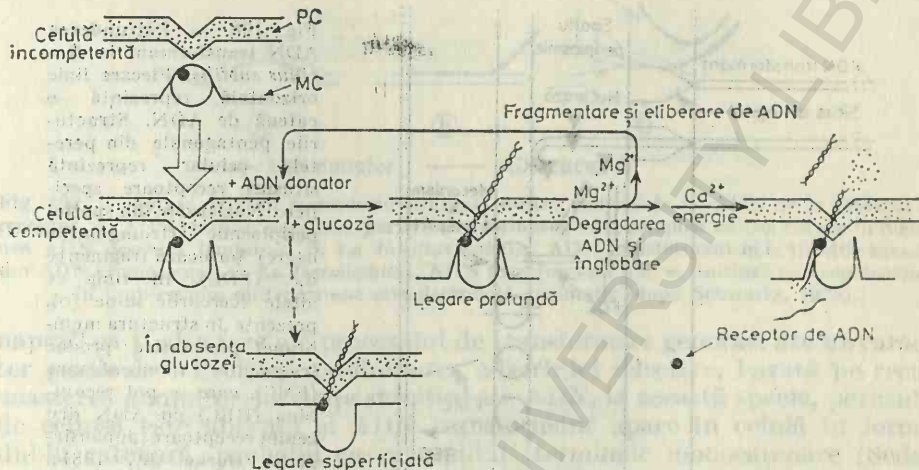


Fig. 197. — Reprezentarea schematică a etapelor transportului ADN prin învelișurile celulare în cursul transformării genetice (după Tomasz, 1978).

Înglobarea ADN transformant în celulă

Se face după un mecanism molecular încă necunoscut. La *B. subtilis* fragmentul transformant este adsorbit inițial cu una din extremitățile sale, într-o regiune în care învelișurile celulare sînt pe cale de creștere. Legarea celei de-a doua extremități a fragmentului de ADN amorsează pătrunderea progresivă, lineară, a moleculei începînd cu extremitatea fixată inițial. Transportul ADN necesită consum de energie și prezența cationilor bivalenți (Ca^{2+} 0,3 mM și Mg^{2+} 1,0 mM). După Brooks-Low și Porter (1978), înainte de înglobare, ADN d.c. transformant ar fi secționat la suprafața celulei de o endonuclează extracelulară (periplasmică) în fragmente de 15–30 kbp la *B. subtilis* și 8–9 kbp la pneumococ, indiferent de dimensiunile inițiale ale fragmentelor de ADN. În cursul intrării în celula bacteriană sau imediat după aceea, ADN d.c. originar devine monocatenar. Aceasta s-ar realiza cu ajutorul unei endonucleaze localizată anizotropic în membrana celulară (numită de Lacks (1977) endonucleaza majoră), care recunoaște, fixează și hidrolizează una din catene (spre exemplu, capătul 5' PO_4), în timp ce „împinge” cealaltă catenă prin membrană (fig. 198). Prin acest mecanism, endonucleaza acționează ca o ADN translocază, care asigură producerea de ADN m.c. și de fragmente mici, furnizînd și energia pentru transport. Ca dovadă, mutantele noz care conțin numai 1% din activitatea endonucleazică a celulelor normale au competență pentru adsorbție, dar nu pot transporta ADN și nu pot suferi transformare genetică.

Moleculele de ADN traversează membrana celulară cu o viteză similară celei observate în cursul procesului de conjugare. S-a stabilit că degra-

darea uneia din catenele ADN d.c. nu se face preferențial și că transferul în celulă se face în ordinea cistronilor în molecula de ADN, proprietate care poate fi folosită în construcția hărților genetice.

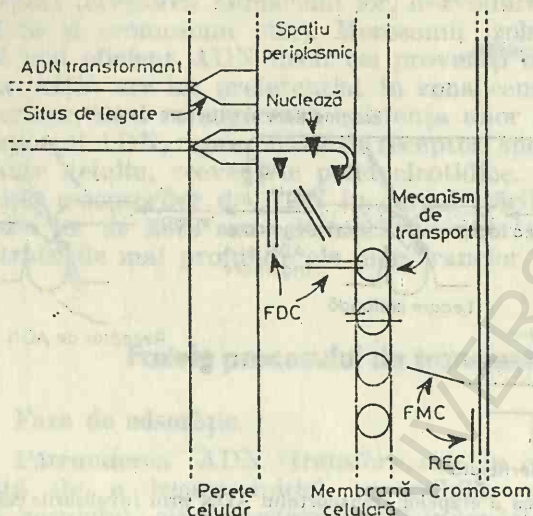


Fig. 198. — Pătrunderea ADN transformant la *Bacillus subtilis*. Fiecare linie orizontală reprezintă o catenă de ADN. Structurile pentagonale din perețele celulare reprezintă situsuri receptoare specifice. Nucleazele din spațiul periplasmic (triunghiurile negre) formează fragmente d.c. (FDC), în timp ce altele (cercurile albe (o), prezente în structura membranei plasmactice produc fragmente monocatenare (FMC), care se pot recombină (REC) cu ADN din celula receptoare (după Birge și Burke Jr., 1981).

După pătrunderea ADN în celula-receptoare, urmează o fază de „eclipsă”, în cursul căreia nu se manifestă nici o activitate transformantă. La pneumococ, perioada de eclipsă durează ~5 min, la 37°C, și se prelungește la temperaturi scăzute (30°C). Starea de eclipsă s-ar datora faptului că la pneumococ și *B. subtilis* în cursul pătrunderii în celulă sau imediat după aceea ADN donor este convertit la ADN m.c., care este lipsit de activitate transformantă (Piechowska, 1971).

Integrarea ADN transformant și recombinarea genetică

Recombinarea genetică consecutivă transferului de genă implică integrarea fizică a uneia din cele două catene ale ADN donor în structura ADN receptor. Procesul se realizează prin substituirea unui segment dintr-o catenă a ADN receptor cu porțiunea corespunzătoare de la donator (Fox, 1968). Eficiența integrării și deci capacitatea transformantă a genelor „străine” este, în esență, determinată de omologia nucleotidelor la situsul de integrare.

Inițial are loc „recunoașterea” regiunii omologe din ADN receptor de către segmentul de ADN transformant, urmată de legarea sau „sinapsa” celor două molecule, având ca substrat molecular posibilitatea de a forma perechi de baze complementare. De aceea, condiția prealabilă este crearea de regiuni localizate de ADN monocatenar în cromosomul bacteriei-receptoare, în momentul în care cele două molecule se aliniază anterior recombinării. După Schwartz (1975), sinapsa s-ar realiza după mecanisme diferite, în funcție de natura bacteriilor (fig. 199). La pneumococ, ADN transformant devenit monocatenar ar forma cu o regiune a ADN cromosomal tranzitoriu deschisă un complex cu trei catene, anterior integrării (fig.

199 A). La *B. subtilis*, ADN cromosomal ar prezenta anumite regiuni cu breșe, care creează segmente monocatenare ce sînt „umplute” de ADN transformant (fig. 199 B) (Harris și Barr, 1971). La *Haemophilus*, „si-

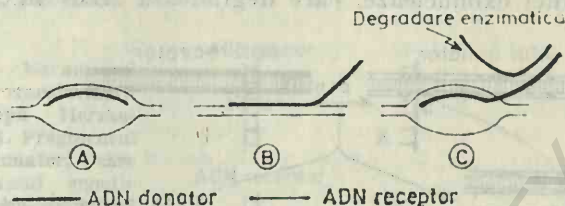


Fig. 199. — Ipoteze privind mecanismul sinapsei dintre moleculele de ADN de la donator și receptor. A. ADN transformant m.c. participă la formarea unui complex cu trei catene în regiunea ADN deschisă temporar. B. La *Bacillus subtilis*, ADN transformant m.c. închide breșele din ADN cromosomal. C. La *Haemophilus*, ADN transformant d.c. se asociază cu cromosomul, în timp ce una dintre catene este degradată enzimatic (după Schwartz, 1975).

napșa” ca și alte faze ale procesului de transformare genetică are un caracter particular. Pe lângă posibilitatea adsorbției selective, bazată pe recunoașterea anumitor secvențe specifice ale ADN, la această specie, perioada de eclipsă este absentă și ADN transformant apare în celulă în formă dublu catenară, probabil cu extremități terminale monocatenare (Sedgwick și Settlow, 1976). În acest caz (fig. 199 C), pe măsură ce are loc asocierea ADN donator — ADN receptor, una din catenele ADN transformant este eliminată pe cale enzimatică.

După modelul lui Fox (1962) și Young (1980), sinapsa se realizează prin împerecherea bazelor din structura ADN m.c. transformant, locus cu locus, cu segmentul corespunzător al ADN receptor devenit monocatenar, la nivelul unei regiuni scurte. Procesul ar fi facilitat de o proteină de legare sau de inserție („wedging protein”), care menține zonele monocatenare în stare extinsă, cu nucleotidele expuse, împiedicînd răsucirea lor helicală și apariția de „bucle” sau „ace de pîr”, prin formarea de perechi de baze interne (din propria lor structură). La sfîrșitul acestui proces, ADN m.c. transformant este integrat fizic în cromosomul bacteriei-receptoare, substituînd una din catenele acestuia. Produsul inițial al recombinării genetice este din punct de vedere fizic și genetic un hibrid. Deoarece cele două catene polinucleotidice corespunzătoare regiunii de recombinare genetică sînt în general omologe, putînd avea una sau mai multe baze diferite și, ca urmare, zone imperfect împerecheate de-a lungul lungimii lor, segmentele respective formează un *heteroduplex*. Cromosomul bacterian care poartă o regiune heteroduplex este numit *heteroduplex parțial*.

În funcție de gradul în care sistemele enzimactice reparatorii corectează aceste imperfecțiuni de omologie și de legare între perechile de baze, unele transformări genetice pot fi anulate. La pneumococ, spre exemplu, există un sistem enzimatic codificat de genele *hex* care corectează bazele greșit împerecheate. La tulpinile *hex*, cu acest sistem funcțional, markerii genetici situați aproape de situsul de legare al enzimei se pierd prin procesul de corectare și recombinarea se face cu eficiență mică. Markerii mai îndepărtați sînt menajați și recombinarea se face cu eficiență mare (fig. 200).

În modelul general de evoluție a transformării genetice se consideră că fenomenele reparatorii care duc la formarea unui heteroduplex implică intervenția inițială a unei endonucleaze, care rupe catena-receptoare nesinapsată și, ulterior, a unei exonucleaze, care degradează ADN m.c., îndepărtînd

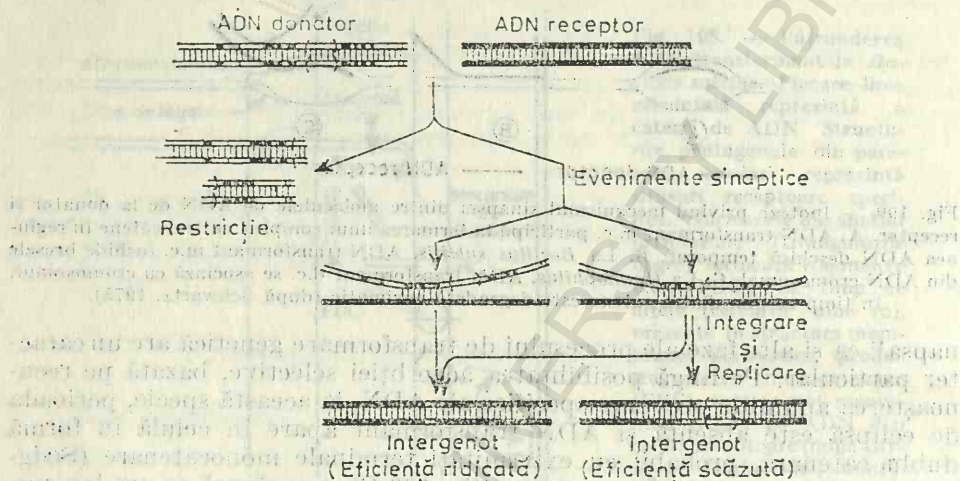


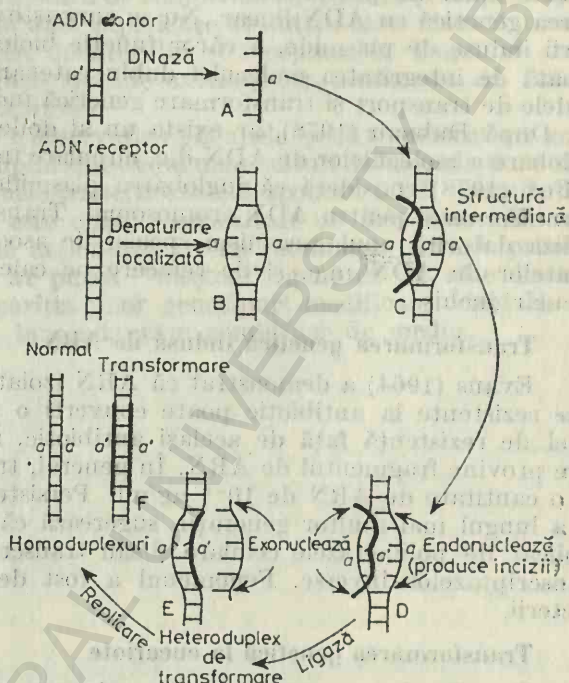
Fig. 200. — ADN transformant pătruns în celula receptoare este degradat de restrictaze sau integrat prin recombinare. ADN d.c. este reprezentat prin două bare orizontale. Regiunile cu secvențe de baze identice apar în negru. Linile subțiri verticale indică perechile de baze corecte între cele două catene de ADN. Regiunea închisă între paranteze corespunde situsului de recombinație a endonucleazei (după Young, 1980).

și porțiunile excedentare. Final, segmentul de ADN transformant este integrat prin acțiunea unei polinucleotid ligaze. În cursul primei diviziuni celulare, prin replicarea semiconservativă a heteroduplexului, se formează două molecule homoduplex și anume una identică cromosomului din celula-receptoare și cealaltă, în care regiunea transformată genetic corespunde integral ca structură regiunii provenită de la ADN donator (fig. 201). Aceasta din urmă va fi localizată într-o celulă de tip recombinant, care prin diviziuni ulterioare va forma o populație de celule transformate genetic. Deși prin transformare poate fi transferat orice caracter, eficiența transferului este variabilă, datorită unor condiții care țin atât de natura chimică a markerului însuși, cât și de aceea a zonei în care este inserat. Ca regulă generală, ADN provenit de la o specie diferită de bacteria-receptoare are o eficiență foarte mică de transformare (cu atât mai mică cu cât sînt mai îndepărtate genetic), deși înglobarea, care este nespecifică, se face la fel de bine.

Frecvența transformărilor genetice. Numărul bacteriilor transformate este în funcție de concentrația ADN utilizat. În anumite limite, procentul bacteriilor transformate variază proporțional cu concentrația ADN, exprimînd faptul că transformarea pentru un marker dat rezultă din interacțiunea bacteriilor cu o singură moleculă de ADN. Dincolo de o anumită concentrație, numărul bacteriilor transformate nu mai crește, deoarece numărul situsurilor de legare este limitat și toate sînt saturate.

Frecvența maximă a transformărilor genetice, în condiții de saturare cu ADN pentru un marker genetic dat, poate atinge 10% din bacteriile competente (deci ~10% din populația totală la pneumococ și ~0,1% la *B. subtilis*).

Fig. 201. — Mecanismul posibil al transformării genetice (după Herskowitz, 1977). A. Fragmentul de ADN donator, care poartă markerul genetic a' , poate forma o sinapsă cu molecula de ADN receptor care a suferit o denaturare localizată (B), evidențiind o secvență, aproximativ complementară, care poartă markerul a . Se formează o regiune heteroduplex aa' (C). Fragmentul este integrat de o ligază, după ce a acționat sistemul reparator al ADN, care a corectat imperfecțiunile de legare și a îndepărtat ADN excedentar (D, E). Replicarea semiconservativă asigură formarea unei celule cu informație genetică identică cu bacteria receptoare și a unei celule recombinante (F).



Transformarea genetică la *E. coli*

În mod normal, *E. coli* nu suferă procesul de transformare genetică, datorită lipsei stării fiziologice de competență.

În condiții de laborator, starea de competență poate fi indusă artificial prin tratare cu CaCl_2 , 0,02 M, la rece. Se utilizează celule în stadiul timpuriu al fazei logaritmice, transferate pentru 3—4 ore într-un mediu mai bogat în nutrienți decât cel în care au fost cultivate inițial (transfer „shift-up”). În aceste condiții, ~ 95% din celule mor, restul putând îngloba ADN transformant și forma recombinanți la 37°C (Cosloy și Oishi, 1973). ADN linear nu are acțiune transformantă la tulpinile sălbatice de *E. coli*, deoarece este degradat rapid de exonucleaza V dependentă de ATP, produsul genei *rec BC*⁺. De aceea, în laborator se folosesc tulpini mutante lipsite de activitate nucleazică (*rec BC*⁻). Transformarea genetică la *E. coli* se poate realiza ușor cu plasmidele R și, în general, cu ADN circular, care, chiar dacă prezintă o breșă, nu poate fi atacat de exonucleaza V. Aceste date demonstrează că *E. coli* are cel puțin două bariere naturale față de transformarea genetică: lipsa competenței naturale și activitatea nucleazică intensă, datorită în special exonucleazei V. De aceea, ea necesită prezența de CaCl_2 , cantități mari de ADN și tulpini mutante, lipsite de activitate nucleazică (Bainbridge, 1980).

Transformarea genetică indusă de plasmide. La *E. coli*, tulpinile sălbatice pot fi transformate numai de ADN circular, transformarea cu ADN linear fiind limitată la mutantele *exo V* (*rec BC*⁻). În general, plasmidele mari (> 20 Kb) transformă relativ ineficient, în comparație cu cele mici. La pneumococ și *B. subtilis* este bine cunoscută transformarea genetică cu ADN linear. Nu se cunoaște însă mecanismul transformării induse de plasmide, a căror funcție biologică în celule este condiționată de integritatea moleculei dublu catenare. Au fost propuse două modele de transport și transformare genetică indusă de plasmide la *Bacillus*. După Dubnau (1978), ar exista un al doilea mecanism particular de înglobare a moleculelor de ADN d.c. circulare închise, în timp ce Loveday și Fox (1978) consideră că înglobarea plasmidelor s-ar face prin același mecanism ca și pentru ADN cromosomal. Transformarea plasmidială s-ar realiza datorită unui mecanism special de asociere intracelulară a fragmentelor de ADN m.c. și de refacere pe cale enzimatică a duplexului circular închis.

Transformarea genetică indusă de ARN

Evans (1964) a demonstrat că ARN izolat din celule de *S. pneumoniae* rezistente la antibiotic poate converti o populație sensibilă, la un nivel de rezistență față de același antibiotic, asemănător tulpinii de la care provine fragmentul de ARN. În general, transformarea a fost indusă cu o cantitate de ARN de 10^{-8} $\mu\text{g/ml}$. Persistența caracterului dobândit, de-a lungul mai multor generații, sugerează că fragmentul introdus este replicat de polimerazele celulare și/sau transcris la ADN, sub acțiunea transcriptazelor inverse. Fenomenul a fost descris și la *E. coli* și alte bacterii.

Transformarea genetică la eucariote

Transferul de material genetic printr-un mecanism similar transformării bacteriene și replicarea lui la descendenți a fost demonstrat la levuri (Oppenoorth, 1960), ca și la celulele provenite de la mamifere (Szybalski, 1962), artropode (Fox, 1971) și plante (Hess, 1972). Cercetările efectuate la *Drosophila* au demonstrat că ADN transformant, care poartă un anumit marker genetic, este încorporat în celule și asociat cu locusul omolog, dar, spre deosebire de bacterii, nu înlocuiește ADN rezident în celulă (în cromosomul receptor), ci persistă împreună cu acesta. Experimentele efectuate pe fibroblaști de șoarece, care au pierdut prin mutație capacitatea de a sintetiza transferază, au demonstrat posibilitatea transformării genetice cu ADN din celule normale de hamster. Fibroblaștii de șoarece recapătă posibilitatea de a produce transferază, dar sintetizează o enzimă cu toate caracteristicile transferazei de hamster.

Semnificația biologică a transformării genetice la bacterii

Deși transformarea genetică este un proces descoperit în laborator, numeroase fapte de observație pledează pentru existența sa în condiții naturale, în medii cu populații bacteriene eterogene și numeroase. În aceste condiții, ADN eliberat prin autoliză celulară, liză fagică sau consecutivă acțiunii unor substanțe nocive (antibiotice) poate pătrunde în celulele competente, transmitându-le, după recombinare, caractere gene-

tice noi, supuse selecției naturale. S-a observat că atunci când culturile ajung la aceleași limite de concentrație celulară, respectiv la 10^6 – 10^7 celule/ml apar evenimente importante pentru evoluția transformării genetice (eliberarea ADN nativ activ în mediu, sinteza și secreția proteinei activator și apariția bruscă a stării de competență). Tomasz (1978) consideră această corelare ca expresia unei experiențe evolutive care vizează o coordonare în timp a fiziologiei donatorului și receptorului. După el, rolul proteinei activator, ca semnal specific extracelular, amintește de funcția hormonilor în sistemele eucariote.

Aceste date, asociate cu observația că la unele specii transformarea genetică se poate realiza prin simplul amestec al unor culturi de bacterii, donator și receptor, ca și faptul că unele bacterii excretă spontan ADN permit concluzia că acest proces nu este doar o curiozitate de laborator. El este prezent și în natură, unde acționează ca un mecanism sexual primitiv prin care unele bacterii ar putea "moșteni" gene de la alte bacterii moarte, contribuind la apariția unor genotipuri modificate, deci la geneza unor clone noi, mai bine adaptate condițiilor de mediu.

Conjugarea bacteriană

(Pl. 24—27)

„Conjugarea este un proces complex, ale cărui detalii abia acum încep să fie înțelese”

M. ACHTMAN

Conjugarea reprezintă transferul de material genetic de la o bacterie-donatoare la o bacterie-receptoare, realizat prin intermediul unei legături intercelulare directe și condiționat de prezența în celula-donatoare a unui element genetic specializat, cu funcție de plasmidă de sex sau conjugon (plasmidă „F”, „R” sau „Col”). Descrisă frecvent la genurile *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Shigella*, *Pasteurella*, *Rhizobium* etc., conjugarea reprezintă, probabil, un mecanism de transfer genetic larg răspândit la bacteriile Gram-negative și mai rar la cele Gram-pozitive. În natură este mai frecventă în populațiile dense ($>10^7$ celule/ml), care asigură mai ușor contactele intercelulare. Apare chiar între specii neînrudite și, în unele cazuri, chiar între genuri de bacterii diferite (Young și Mayer, 1979).

Descoperirea fenomenului de conjugare s-a datorat cercetărilor Lederberg și Tatum (1946). Pornind de la o tulpină sălbatică (cu caracter prototrof) de *E. coli* K12, aptă să-și sintetizeze singură toate moleculele organice complexe și, ca atare, capabilă să se dezvolte pe un mediu de cultură minimal (sau de bază, care conține numai câteva substanțe simple și este lipsit de factori de creștere), au selecționat, prin acțiunea mutagenă a radiațiilor UV, mai multe tulpini mutante multiple auxotrofe, cu deficiențe biochimice caracteristice.

Mutantele poliauxotrofe au drept „markeri” genetici incapacitatea de sinteză a câte doi, trei sau respectiv patru factori de creștere, ceea ce face obligatorie cultivarea lor pe un mediu complet, adică pe un mediu care să conțină factorii respectivi adăugați ca atare de la exterior. Selecția a fost făcută în așa fel încât să se obțină cupluri de mutante, care își completează reciproc incapacitățile de sinteză, în sensul că fiecare mutantă, incapabilă să sintetizeze anumiți factori de creștere, are, în schimb, capacitatea de a produce factorii pe care cealaltă nu-i poate sintetiza. După cultivarea separată a două tulpini auxotrofe, A și B, pe un mediu complet, conținând patru factori de creștere — deci satisfăcând exigențele ambelor tulpini, s-au însămințat, pe un mediu minimal solid (lipsit de factori de creștere), în cantități egale de celule, atât fiecare tulpină separat, cât și un amestec din ele. La examinarea plăcilor după incubare s-a observat că, dacă pe plăcile unde fuseseră însămințate tulpinile auxotrofe separat nu

creșcuse nici o colonie, pe plăcile însămînțate cu amestecul celor două tulpini au apărut, după două zile, circa 20 de colonii, care erau desigur prototrofe, deci capabile să sintetizeze toți cei patru factori de creștere, deoarece altfel nu s-ar fi putut dezvolta pe mediul minimal (fig. 202).

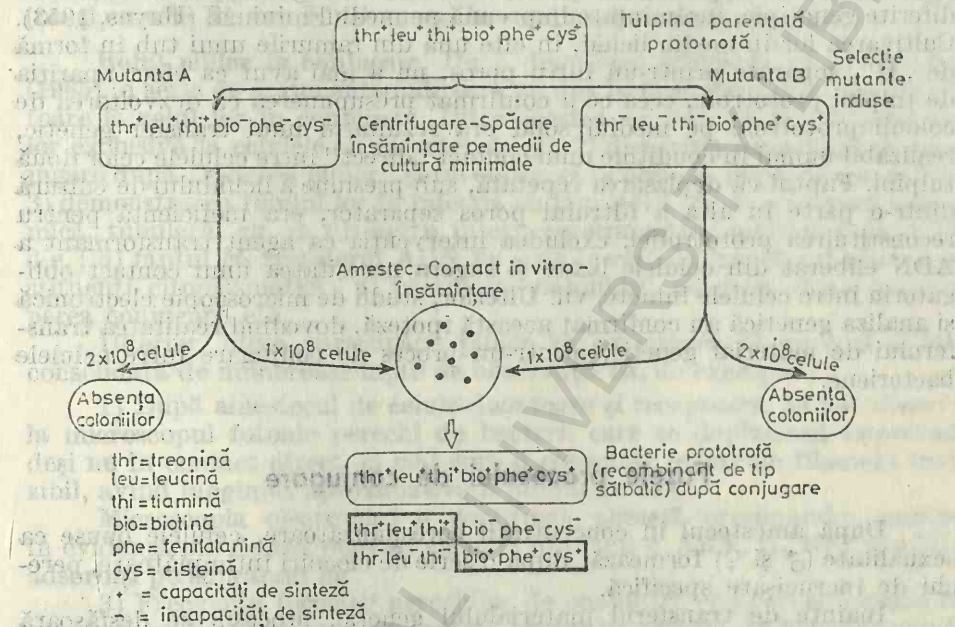


Fig. 202. — Schema experienței lui Lederberg și Tatum demonstrând transferul de material genetic prin conjugare la *E. coli* K12.

Într-o a doua serie de experiențe au fost utilizate, cu rezultate similare, două tulpini de *E. coli* K12, care cumulau câte trei defecte nutriționale, de asemenea complementare. Prima dintre ele (A) era auxotrofă pentru treonină, leucină și tiamină, iar cea de-a doua (B) pentru biotină, fenilalanină și cisteină. Genotipurile celor două tulpini erau deci: A) $thr^- leu^- thi^- bio^+ phe^+ cys^+$ și B) $thr^+ leu^+ thi^- bio^- phe^- cys^-$. Genotipul bacteriilor recombinante avea structura: $thr^+ leu^+ thi^+ bio^+ phe^+ cys^+$, corespunzând deci tipului de metabolism prototrof.

Căutându-se explicația acestui fenomen, s-a avut mai întâi în vedere faptul că, teoretic, utilizarea unor tulpini dublu sau triplu mutante, adică deficiente în ceea ce privește sinteza a câte doi sau trei factori de creștere exclude de la început posibilitatea unei reversii spontane la condiția prototrofă, deoarece probabilitatea reversiei este extrem de mică. Este demonstrat că retromutația unui singur caracter și reversia la condiția prototrofă se realizează cu o frecvență de 10^{-7} într-o zi. În cazul tulpinilor dublu mutante, apariția reversiei la tipul prototrof, prin retromutația a două caractere deficitare, are, teoretic, o frecvență de 10^{-14} (pentru că fiecare retromutație se realizează cu o probabilitate de 10^{-7}). În sfârșit, în cazul mutantelor triplu deficiente, presupunând, de asemenea, că evenimentele

reversiei sînt independente, frecvența teoretică a revenirii la condiția prototrofă este de 10^{-21} . Or, în experiențele citate, prototrofele apar cu aceeași frecvență ($\sim 1 \times 10^{-6}$), indiferent dacă se amestecă tulpini cu o singură, cu două sau cu trei deficiențe genetice.

Rămînea ca plauzibilă ipoteza unui transfer genetic între bacteriile diferite genotipic, însămințate împreună pe mediul minimal (Hayes, 1953). Cultivarea lor în mediu lichid, în cîte una din ramurile unui tub în formă de „U”, separate printr-un filtru poros, nu a mai avut ca efect apariția de tulpini prototrofe, ceea ce a confirmat presupunerea că dezvoltarea de colonii prototrofe pe mediul solid era rezultatul unui transfer genetic, realizabil numai în condițiile unui contact „direct” între celulele celor două tulpini. Faptul că deplasarea repetată, sub presiune a lichidului de cultură dintr-o parte în alta a filtrului poros separator, era inefficientă pentru reconstituirea prototrofiei, excludea intervenția ca agent transformant a ADN eliberat din celulele lizate și sugera necesitatea unui contact obligatoriu între celulele intacte, vii. Ulterior, studii de microscopie electronică și analiza genetică au confirmat această ipoteză, dovedind realitatea transferului de material genetic, printr-un proces de conjugare între celulele bacteriene.

Fazele procesului de conjugare

După amestecul în concentrații corespunzătoare, celulele opuse ca sexualitate (♂ și ♀) formează, după o serie de ciocniri întîmplătoare, perechi de încrucișare specifică.

Înainte de transferul materialului genetic, procesul se desfășoară în trei etape, avînd o succesiune caracteristică (Achtman, 1978). Prima etapă este reprezentată de formarea cuplurilor de perechi specifice; vizibile la microscopul cu contrast de fază (Lederberg, 1956) și la microscopul electronic (Anderson, Jacob și Wollman, 1957), instabile la o agitare ușoară, rezultînd din unirea bacteriilor donatoare și receptoare. Formarea cuplurilor de conjugare a fost demonstrată și cu ajutorul unui numărator electronic de particule, care a arătat, după amestecul a două populații de celule Hfr și F⁻, o scădere însemnată a numărului de particule și revenirea la numărul inițial după agitarea suspensiei. Această fază implică legarea extremității libere a pilului F de un receptor celular situat pe suprafața bacteriei ♀. Etapa este numai tranzitorie, deoarece în cîteva secunde, suprafețele celor două celule sînt aduse — printr-un mecanism încă necunoscut — într-un contact strîns perete la perete.

În această a doua etapă, preliminară transferului, contactele dintre pereții celulari sînt fragile și pot fi desfăcute prin forțe ușoare de agitare.

Etapă a treia corespunde fazei de formare a unor contacte stabile între pereții celulari (Achtman, 1978), proces descris de Curtiss (1969), sub denumirea de *formarea de perechi eficiente*. Stabilizarea contactelor intercelulare are loc în cel mult cîteva minute și are ca rezultat formarea de agregate stabile de încrucișare, rezistente la forțele de dispersare (agitare) ușoare. În unele cazuri, la 15 minute după amestecul unor populații pure de bacterii-donatoare și receptoare, 75% din celule sînt agregate stabil. Inițial, s-a considerat că agregatele de încrucișare între celulele

♂ și ♀ se formează în proporție de 1 : 1. Achtman (1978) a arătat că, de regulă, sint alcătuite fie din 2—4 celule, fie din 8—13 celule, cînd raportul celulelor Hfr : F⁻ este de 1 : 10. Dacă raportul este inversat, celulele F⁻ suferă lezări grave ale membranei, cunoscute sub denumirea de *zigosis letal* („lethal zygosis”). Fenomenul se manifestă numai cu tulpinile Hfr (nu și cu cele F⁺ sau F') și numai în condiții de aerare a culturii.

Rolul pililor în conjugare. După descrierea pililor de către Brinton (1965), o serie de argumente indirecte au dus la formularea ipotezei referitoare la rolul lor în conjugare. Între acestea au fost citate : 1) prezența lor exclusivă la celulele cu caracter de ♂ ; 2) dispariția capacității de conjugare după „raderea pililor” și revenirea ei la normal, după refacerea lor ; 3) demonstrarea rolului lor în infecția cu fagi ARN ♂ ; 4) structura anatomică, tubulară, cu un diametru intern corespunzător moleculei de ADN d.c. ; 5) faptul că transferul ADN nu este însoțit de transferul altor constituenți citoplasmatici ; 6) păstrarea viabilității celulelor după întreruperea conjugării etc.

Ulterior, ideea participării pililor în conjugarea bacteriană a fost consolidată de numeroase fapte de observație ca, de exemplu :

1) După amestecul de celule-donatoare și receptoare, se pot observa la microscopul fonic perechi de bacterii care se deplasează împreună, deși nu în contact direct, ci mai curînd conectate printr-un filament invizibil, avînd lungimea aproximativă a pilului de sex.

Microscopia electronică a confirmat această presupunere, punînd în evidență pili de sex marcați cu unul din fagii ♂ ARN, f1, MS2 sau M13 adsorbiți pe suprafața lor.

3) Frecvența formării perechilor de conjugare este corelată strîns cu numărul mediu al pililor pe suprafața celulei bacteriene. În general, numărul mediu al pililor pe celulele F⁺, F' și Hfr este mai mare cînd mediul este foarte bogat în substanțe nutritive și în ușoară anaerobioză. Înfometarea celulelor-donatoare și cultivarea în aerobioză intensă determină pierderea pililor și odată cu aceasta pierderea capacității de donator, în timp ce revenirea la condițiile normale determină capacitatea de resinteză a pililor și odată cu aceasta refacerea capacității de a forma perechi specifice. De asemenea, mutantele fără pili (pil⁻), cu pili modificați, ca și celulele F⁺ cu pili îndepărtați prin agitare violentă sînt incapabile să facă transfer de material genetic.

4) Adăugarea de fagi ARN ♂ sau ADN ♂ specifici la culturile de tulpini donator, înainte de sau în momentul încrucișării interferează cu formarea de perechi specifice, diminuînd frecvența de apariție a recombinanților. Extremitatea liberă a pililor pare să fie esențială, deoarece adăugarea de fagi ADN ♂ specifici, care se adsorb numai pe extremitatea pililor (fig. 203), inhibă mult mai eficient formarea de perechi specifice de conjugare, decît fagii care se leagă de laturile pililor (Ou și Reim, 1978). Pe lîngă numărul pililor, rata și frecvența formării de perechi specifice de conjugare sînt influențate și de unii factori de mediu ca densitatea celulelor, viscozitate etc., care afectează frecvența coliziunilor între celule.

Mecanismul de acțiune al pililor este încă discutat.

A) După ipoteza lui Brinton („conduction theory”), pili s-ar comporta ca structuri specializate, acționînd ca un adevărat canal (tunel sau

punte) de conjugare, prin care are loc transferul de ADN. Deși pînă în prezent nu s-a demonstrat prezența ADN în interiorul pililor, ipoteza este atractivă, ținînd seama de unele argumente ca: 1) diametrul intern al canalului pilului ($\sim 2,5$ nm), foarte potrivit pentru transferul ADN, fără transmiterea concomitentă și a citoplasmei de la donator; 2) studiul perechilor de *E. coli* aflate în contact lax, prin conexiuni invizibile, la distanțe corespunzătoare lungimii pililor de sex, separate prin agitare, după 30 minute de contact, a demonstrat existența unui transfer de material genetic la o mare parte din exconjuganți.

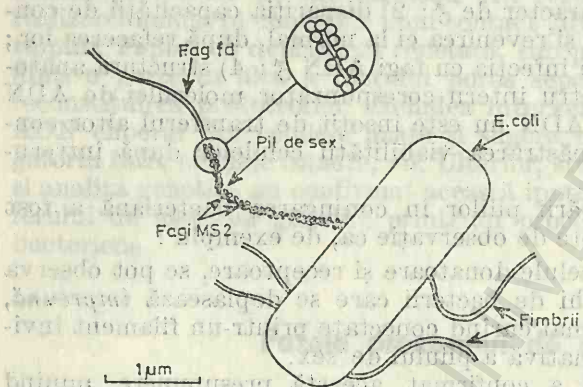


Fig. 203. — Reprezentarea schematică a flagilor specifici masculi, legați de pilii de sex, la o bacterie Ft sau Hfr (după Brainbridge, 1980).

B) După ipoteza retracției pilului (Wriss și Marvin, 1969), pilii ar fi simple organite specifice de legare, acționînd ca un „cîrlig de agățare” sau ca un cablu de amaraj, care ar servi în faza inițială a formării perechilor de conjugare, pentru a aduce donorul și receptorul în contact strîns. După formarea perechilor specifice stabile, care implică interacțiunea dintre suprafața bacteriei receptoare și extremitatea liberă a pilului de sex, ar urma retracția acestuia (cu consum de energie) în celula ♂ sau în celula ♀, fenomen care ar aduce celulele bacteriene în contact direct (perete celular la perete celular) (Curtiss, 1965). Legătura dintre pil și suprafața celulei-receptoare se face cu ajutorul unei substanțe proteice, specificată de plasmida de sex, care acționează pentru legarea celor două celule și pentru a acoperi „gaura” rămasă în peretele donatorului, după ce s-a produs retracția totală a pilului. Ulterior, ar avea loc trecerea ADN de la donator la receptor, printr-o legătură intercelulară directă, care se formează după ce celulele au venit în contact.

Datele experimentale obținute pe cupluri individuale demonstrează că acest contact intercelular strîns facilitează transferul de material genetic și crește fertilitatea conjugării: frecvența formării de recombinanți între perechile strîns legate este de două ori mai ridicată decît în cazul perechilor laxe (Ou și Adelberg, 1970).

C) Unele date recente (Achtman, 1978) aduc probe în favoarea ideii că pilii de sex sînt necesari numai în faza inițială, de legare instabilă între donator și receptor. După ce agregatele stabile de încrucișare s-au format, îndepărtarea pililor cu sodiu dodecilsulfat nu influențează evoluția procesului de conjugare, ceea ce demonstrează că prezența lor nu este esențială

după această fază, nici pentru menținerea celulelor conjugante și nici pentru transferul de ADN. Studiile de microscopie electronică au mai arătat, pe lângă faptul că nu toate contactele realizate prin pili de sex sînt convertite în contacte perete la perete celular, o serie de aspecte neobișnuite, ca de exemplu :

1) Prezența de celule asociate în agregate de încrucișare ce pot conține pînă la ~50 de celule, între care pot fi detectate numai cîteva conexiuni prin pili, cele mai multe fiind în contact direct prin peretele celular.

2) Cazuri în care unele celule-donatoare sînt în contact direct cu doi sau mai mulți parteneri aparținînd tipului de încrucișare opus, după cum, frecvent, unele celule-donatoare sînt în contact direct atît cu alte celule-donatoare, cît și cu celule-receptoare.

3) Uneori, transferul poate avea loc de la un donator la doi receptori, ca și de la doi donatori la un singur receptor. Aceste aspecte particulare par să se datorească faptului că suprafețele celulare posedă mai mult de un situs la nivelul căruia poate avea loc un contact eficient și prin care ADN poate fi transferat.

Genetica și biochimia etapelor preliminare transferului de ADN

Nu se cunosc bazele genetice și biochimice ale fazei de legare a pilului de sex de suprafețele receptoare ale celulei ♀ și nici cele ale etapei a doua, de formare a unor contacte instabile, perete la perete între cele două bacterii care se vor conjuga. După Tomasz (1978) și Achtman (1978), procesele pregătitoare ale transportului efectiv de ADN prin membranele celulare ar necesita intervenția produșilor a cel puțin 32 de gene. Probabil că cei mai mulți produși ar acționa pentru a dirija ADN donator cît mai aproape de membrana plasmatică a celulei receptoare, printr-o lezare controlată a suprafeței acesteia. O altă funcție a acestor factori ar fi aceea de a participa la juxtapoziția structurilor specifice donatorului, în raport cu situsurile corespunzătoare de pe suprafața bacteriei receptoare.

Harta genetică a plasmidei „F” de la *E. coli* (fig. 204) conține cel puțin 20 de cistroni identificați, localizați într-o regiune de ~20 Mdal regiunea *tra* (transfer DNA) (Willetts, 1978). După Achtman (1978), această regiune ar cuprinde informație pentru ~40 de cistroni. Deși pili de sex au o structură simplă, fiind formați dintr-un singur tip de proteină — *pilina* — sinteza și asamblarea lor pare să fie un proces complex. Cel puțin 12 proteine, corespunzînd cistronilor *tra A*, *tra L*, *tra E*, *tra K*, *tra B*, *tra C*, *tra F*, *tra H* și unei părți din *tra G*, precum și alte 3 proteine adiționale sînt implicate în acest proces. Clonarea acestui segment de plasmidă într-o celulă bacteriană, prin tehnici de inginerie a genelor, induce formarea pililor de sex (Achtman, 1978). Stabilizarea cuplului de conjugare necesită prezența genei *tra G* funcționale, pe plasmida F, și a proteinei II* (codificată de cistronul *omp A*) în membrana externă a peretelui celular la bacteria receptoare.

*Proteina II**, avind g.m. $\sim 33\,000$ dal este o proteină integrată a membranei externe, prezentă în $\sim 100\,000$ copii per celulă, străbătind integral această membrană (proteină transmembranară). Are rolul de receptor de fagi, este esențială pentru transportul nespecific al unor aminoacizi prin membrana externă, pentru omorîrea bacteriilor intacte de către colicinele K și L, și, de asemenea, în conjugare, pentru formarea cuplurilor stabile de conjugare (faza a treia a etapelor preliminare transferului de ADN) (Manning, 1977).

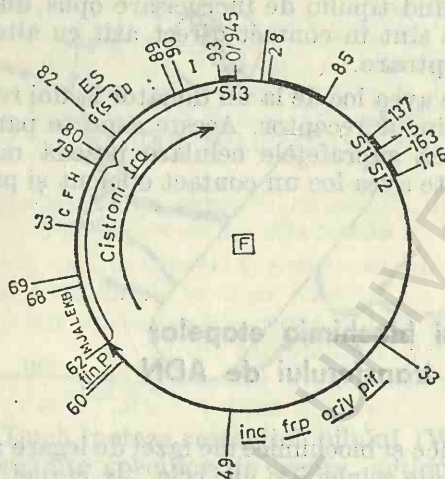


Fig. 204. — Harta fizică a plasmidei F, cu indicarea unor cistroni ai operonului *tra*. Coordonatele sînt date în Kb. Săgeata indică direcția de transcriere a operonului *tra* (după Achtman, 1978).

Mutantele care nu au această proteină funcțională sînt caracterizate prin incapacitatea bacteriilor-receptoare de a forma cupluri stabilizate. Transferul ADN necesită cel puțin producția genelor *tra D*, *tra I* și *tra M*. În absența lor, bacteriile formează agregate stabile de conjugare, dar transferul de ADN nu are loc. În sfîrșit, producția genelor *tra I* și *tra M* joacă și rol de reglare în declanșarea transferului (Achtman, 1978).

Conjugarea dintre bacterii F^+ și F^+

Bacteriile F^+ „ignoră” în mod obișnuit alte bacterii F^+ . Deși suprafețele celulelor bacteriene-donatoare (F^+) sînt aparent la fel de potrivite ca și cele receptoare pentru realizarea unor contacte instabile perete celular—perete celular, ele nu pot realiza reacția de legare stabilă. Chiar în cazurile rare, în care se formează agregate stabile de celule-donatoare (δ), transferul de ADN între ele este inhibat (Curtiss, 1969).

Acest efect este asigurat prin două mecanisme moleculare diferite, codificate de plasmide:

a) prin proprietatea numită *excludere de suprafață* („surface exclusion”) (Meynell, 1969), diferită ca mecanism genetic de incompatibilitate, bazată pe incapacitatea celulelor-donatoare de a stabili uniri stabile între ele și pe slaba capacitate de a acționa ca receptori de material genetic (Achtman, 1978);

b) prin intervenția unui mecanism complex, controlat genetic, care implică prezența proteinelor *Tra Tp* (produs al cistronului *Tra T*) și *Tra Sp* (produs al cistronului *Tra S*), a pililor de sex și a unui strat peptidoglicanic normal în structura peretelui celular. Proteina *Tra Tp*, localizată în membrana externă a bacteriilor care poartă plasmide de sex, împiedică formarea de contacte stabile intercелulare și prin aceasta nu permite transferul „homosexual”, al ADN (Achtman, 1978).

Conjugarea dintre bacterii F^+ și F^-

În conjugarea $F^+ \times F^-$, evenimentul inițial, principal, după formarea cuplului de conjugare, este apariția unei incizii sau breșe („nick”) monocatenare în structura plasmidei de sex, probabil la nivelul replicatorului (Jacob și Brenner, 1963), determinată, se pare, de o endonuclează codificată de plasmida F. Semnalul care declanșează această incizie este probabil generat de interacțiunea inițială dintre extremitatea pilului și suprafața celulei-receptoare. Probe biochimice și genetice arată că ADN este transferat în formă monocatenară și anume prin catena ce are o extremitate 5' la situsul genei care codifică originea transferului (Gross și Caro, 1966; Kingsman și Willetts, 1978). Întrucât transferul are loc cu o eficiență mare, caracterul F^+ se răspindește rapid într-o populație bacteriană. Proporția celulelor F^- scade progresiv.

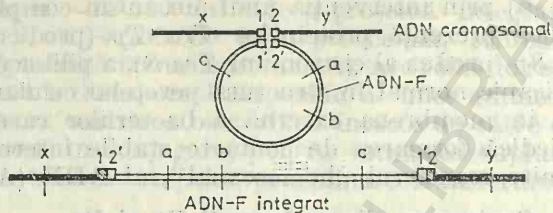
Factorul F și „sexualitatea masculă” au un caracter infecțios la procariote și determină o „masculinizare epidemică” a populației bacteriene expuse. După aproximativ o oră de contact, peste 50% din celulele F^- devin F^+ . Modelul descris face din transferul genetic un caz special al replicării plasmidei F. Într-o celulă F^+ care nu se conjugă, replicarea plasmidei F determină formarea unei copii (molecule) care se deplasează și se leagă de un situs de fixare mezosomal, în interiorul celulei respective. Când celula purtătoare a plasmidei F se conjugă, replicarea plasmidei duce la transferul unei copii în partenerul de conjugare.

Conjugarea dintre bacterii Hfr și F^-

Unele bacterii F^+ pot suferi mutații — survenite cu o frecvență mică, de 10^{-4} — 10^{-5} per generație de celule — care dau naștere unei stări de supermascul, denumită prescurtat Hfr (High frequency of recombination). Substratul molecular al acestei stări este reprezentat de inserarea și integrarea plasmidei F (fig. 205) în continuitatea cromosomului bacterian al celulei ♂ și anume, într-o regiune a acestuia pentru care plasmida are o afinitate particulară. Deoarece tulpinile Hfr se formează printr-o serie de evenimente de integrare independente, ele formează o populație eterogenă, datorită numărului mare de situsuri de integrare cromosomale, cărora le corespund o varietate de origini și de direcții de transfer cromosomal (Susman, 1970).

La *E. coli* K12 au fost identificate pînă în prezent aproximativ 22 de situsuri de integrare numite situsuri de afinitate pentru factorul sex („sex factor affinity”) și, ca urmare, tot atîtea tipuri de bacterii Hfr (fig. 206). Probabil, toate aceste situsuri cromosomale conțin secvențe de inserție, care sînt prezente și pe plasmide, în așa fel încît integrarea apare ca rezultatul unui proces de recombinare normală între regiuni omologe de ADN.

Fig. 205. — Modelul clasic de integrare a unei plasmide F cu funcții episodice în cromosomul bacteriei *E. coli* K 12, pentru transformarea acesteia într-o bacterie Hfr.



Trecerea de la starea F^+ la starea Hfr conferă celei proprietăți noi în ceea ce privește replicarea materialului genetic și comportarea lui în procesul de conjugare:

1) Factorul F integrat în structura cromosomului bacterian își pierde capacitatea de replicare independentă și se comportă ca un segment obișnuit al cromosomului, fiind replicat pasiv, de-a lungul structurii acestuia și transmis ca atare de la o generație la alta.

2) Factorul F integrat încetează să mai fie infecțios, deoarece nu mai este transmis decât excepțional de rar, el constituind totdeauna porțiunea terminală a cromosomului angajat în transfer în cursul conjugării.

3) Integrarea lui duce la ruperea cromosomului bacterian în timpul conjugării și la transferul acestuia cu o eficiență foarte mare (până la 100 %), sub forma unei structuri lineare polarizate.

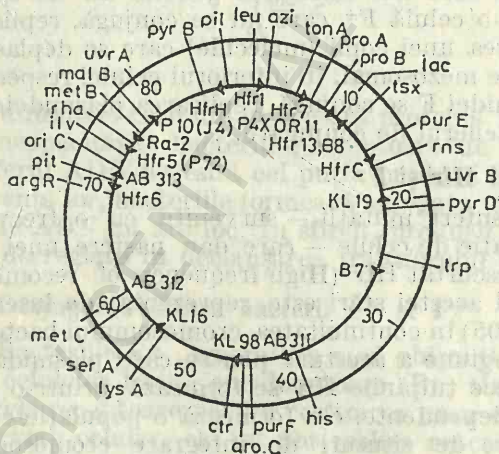


Fig. 206. — Harta genetică a *E. coli* cu indicarea originii transferului cromosomal al mai multor tulpini Hfr. Săgețile de pe cercul intern indică direcția transferului. Pentru fiecare tip de bacterie Hfr, markerii care sînt transferați inițial și final sînt indicați pe cercul extern (după Taylor și Trotter, 1967).

Studiul genetic al diferitelor cupluri de conjugare $Hfr \times F^-$ a arătat că diferitele tipuri de celule Hfr au o genă diferită la capătul anterior al cromosomului transferat și că unele gene care se transferă cu frecvență mică la unele tulpini, se transferă cu o frecvență foarte mare la altele (fig. 207). Această comportare confirmă concepția conform căreia bacteriile Hfr au apărut independent, prin inserția factorului F în diferite poziții ale cromosomului bacterian. Compararea tulpinilor Hfr sugerează că cromosomul bacterian este transferat aparent ca o structură lineară și că

aranjamentul genelor de-a lungul său este același, singurul lucru care diferă este ordinea în care ele sînt transferate de la diferitele tulpini Hfr la bacteriile F⁻. În plus, s-a demonstrat că pentru fiecare tip de celule Hfr

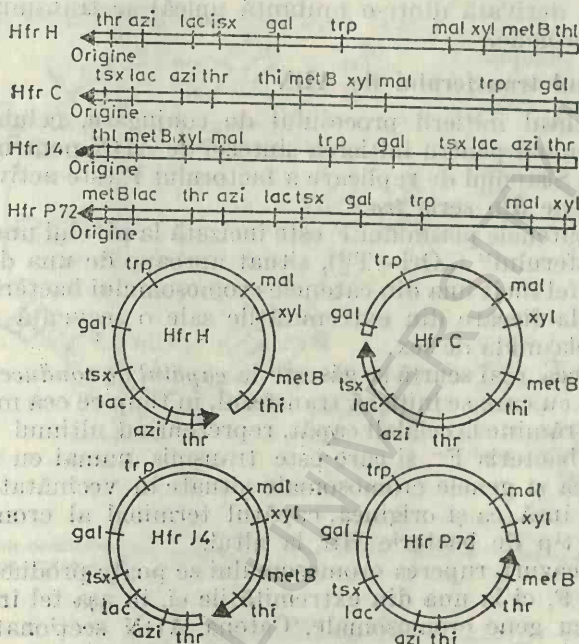


Fig. 207. — Secvența transmiterii genelor în cazul a patru tulpini de *E. coli* Hfr, în funcție de ruperea cromosomului circular în situsuri diferite. Săgețile indică genele care intră primele. Fiecare set linear de gene reprezintă o permutare a aceleiași ordini circulare de gene (după Strickberger, 1976).

există un segment caracteristic al cromosomului, care, în mod obișnuit, nu este transmis deloc. Aceste observații demonstrează că cromosomul bacterian se prezintă ca un grup unic de linkaj și că, de fapt, acesta nu are nici un „început” și nici un „sfârșit” definite, fapt care nu poate fi interpretat decât ca avînd forma unui cerc închis (punct de vedere confirmat și de studiile autoradiografice ale lui Cairns, 1963). Întrucît transferul cromosomului are loc ca o structură lineară, este evident că factorul F integrat poate amorsa trecerea de la starea circulară la starea lineară prin „ruperea” cromosomului circular, la nivelul unui punct specific de deschidere.

Deoarece locul de inserție a factorului F în cromosomul bacterian variază de la o bacterie Hfr la alta, este evident că cromosomii lineari, care vor lua naștere în diferitele tipuri de bacterii Hfr, vor avea diferite capete anterioare (capătul „originea transferului” sau capătul conducător al transferului („leading”), depinzînd de situsul ocupat de plasmida F). Astfel, dacă un cromosom bacterian este alcătuit din gene care se succed în ordinea A, B, C, D, E . . . Z, prima genă angajată în transfer poate fi oricare dintre ele, cu condiția proximității ei de locul de inserție a factorului F; care, după ruperea cromosomului la acest nivel, ajunge să fie

situat la extremitatea opusă a structurii devenite lineare. Ca urmare, fiecare tip de bacterie Hfr va transmite inițial alte segmente ale cromosomului bacterian. Numai cînd populația bacteriană Hfr este o clonă pură (de același tip, derivată dintr-o mutantă unică) se transmit inițial, totdeauna, aceleași gene.

Mecanismul transferului de ADN

În momentul inițierii procesului de conjugare, celulele F⁻ trimit celor Hfr un semnal pentru inițierea sintezei de ADN pentru transfer (Ou și Reim, 1978). Sistemul de replicare a factorului F este activat și datorită acțiunii unei gene din seria *tra*.

Una din catenele plasmidei F este incizată la nivelul unui situs numit „originea transferului” („Ori—T”), situat aproape de una din extremitățile sale, în așa fel încît una din catenele cromosomului bacteriei Hfr devine lineară, avînd la fiecare din extremitățile sale o secvență de nucleotide provenite din plasmida de sex.

Secvența cea mai scurtă se găsește la *capătul de conducere* („leading”) sau „originea”, cu care se inițiază transferul, în timp ce cea mai mare parte din plasmida F rămîne la celălalt capăt, reprezentînd ultimul segment care poate intra în bacteria F⁻ și care este transmis numai cu o foarte mică probabilitate, ca și genele cromosomale situate în vecinătatea lui. După cum am arătat însă, ca și originea, capătul terminal al cromosomului diferă de la un tip de bacterie Hfr la altul.

În unele cazuri, ruperea cromosomului se poate produce nu în structura plasmidei F, ci la una din extremitățile ei, în așa fel încît transferul începe direct cu gene cromosomale. Catena ADN secționată este introdusă în bacteria F⁻ cu extremitatea sa 5'. Transferul începe și progresează pe măsură ce în celula-donatoare ADN polimeraza reface structura dublu helicală a cromosomului Hfr, folosind ca matriță catena cromosomală rămasă nemodificată.

Etapele consecutive transferului

Celula-donatoare F⁺ își păstrează acest caracter, deoarece catena rămasă intactă în interiorul ei servește ca matriță pentru sinteza (în direcția 5' → 3') unei catene complementare, după modelul „cercului rotativ”, reconstituind astfel prezența unei plasmide de sex intacte (ADN d.c. superhelical). Procesul de replicare a ADN în celula parentală (donatoare) furnizează forța de propulsie care asigură transferul progresiv al catenei ADN incizate, care, la rîndul său, servește ca matriță pentru sinteza unei molecule complementare și deci pentru formarea unei copii a plasmidei F în celula-receptoare. În acest fel, celula-receptoare va conține o plasmidă F, formată dintr-o catenă sintetizată anterior conjugării (provenită de la donator) și alta sintetizată în cursul transferului.

ADN monocatenar este transferat cu o viteză de ~5 Mdal pe minut, respectiv cu o viteză comparabilă celei în care se realizează transcrierea ADN și mai mică decît viteza de replicare a cromosomului bacterian (Achtman, 1978). În acest caz, la ~5—10 minute după un transfer reușit, celu-

lele se despart, încheind astfel ciclul (fig. 208), spre deosebire de cuplurile $Hfr \times F^-$, care sînt mult mai stabile și se separă numai după 60–80 minute.

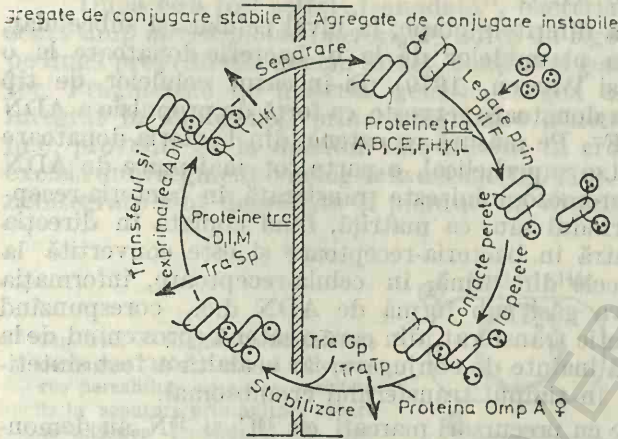
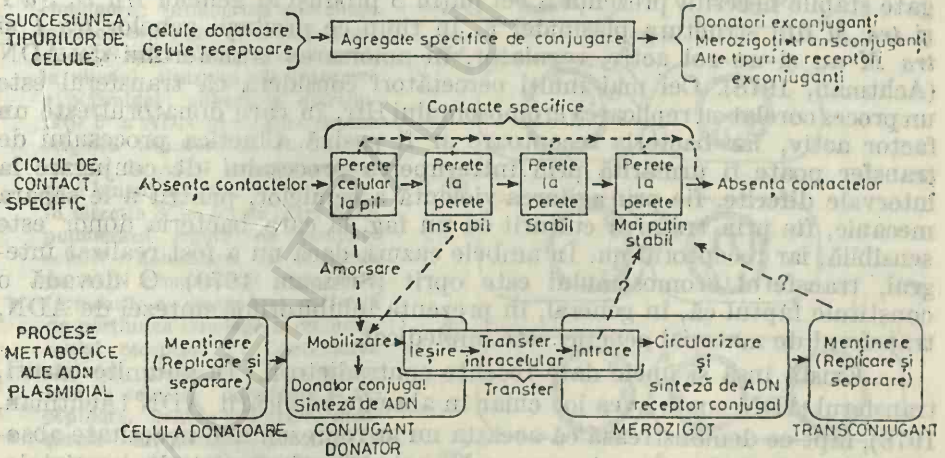


Fig. 208. — Reprezentarea schematică a ciclului de conjugare la bacterii cu indicarea proteinelor necesare celulelor donator (în interiorul cercului). Proteina *Omp A* este necesară celulelor receptoare. Săgețile hașurate indică sediul blocării procesului (după Achtman, 1978).

Fig. 209. — Reprezentarea sintetică a fazelor procesului de conjugare care determină transferul plasmidelor, la nivel celular și la două nivele subcelulare (după Clark și Warren, 1979).



În urma transferului, ambii exconjuganți* au caracterul de ♂. Înainte ca o plasmidă să fie aptă pentru un nou transfer, trebuie să treacă

* Exconjugant — denumire generică pentru celulele care au participat la conjugare (indiferent dacă au fost F^+ , Hfr sau F^-). Celula bacteriană care a primit material genetic de la o altă bacterie este denumită *transconjugant*. Denumirea de *recombinant* este rezervată celulelor în care materialul genetic transferat a fost inserat în repliconul preexistent în celula-receptoare. În cazurile în care materialul transferat este perpetuat *per se* (ca o plasmidă), de la o generație la alta, celula este denumită *transconjugant plasmidial*. Dacă materialul genetic transferat nu este de natură plasmidială (ci un fragment cromosomal) și nu se poate replica, el este pierdut prin diluare în populația bacteriană. În acest caz, celula receptoare este denumită *transconjugant abortiv*. Noțiunea de transconjugant exprimă sensul de transfer al materialului genetic, indiferent de soarta lui după separarea celulelor conjugante.

(pentru motive încă necunoscute) ~50 minute (Birge, 1981). În agregatele stabile, transferul ADN se realizează cu mare eficiență, în așa fel încît, în condiții optime, fiecare bacterie-donatoare transferă ADN și fiecare celulă-receptoare primește ADN.

Fig. 209 sintetizează diferitele etape, la nivel celular și subcelular, care asigură transmiterea plasmidelor de la o bacterie-donatoare la o celulă-receptoare (Clark și Warren, 1979). Și în cazul celulelor de tip Hfr sinteza ADN în celula donatoare servește ca forță de propulsie a ADN m.c. secționat, în celula F⁻. Pe măsură ce catena din bacteria-donatoare este convertită la ADN d.c. superhelical, o parte tot mai mare de ADN m.c. de la capătul 5' al cromosomului este transferată în bacteria-receptoare, unde servește, la rîndul său, ca matriță, fiind copiată în direcția 5' → 3', pe măsură ce intră în bacteria-receptoare și este convertită la ADN dublu helical. În cele din urmă, în celula-receptoare, informația genetică transferată se va găsi sub formă de ADN d.c., corespunzînd porțiunii de material genetic transferat, din care o catenă (provenind de la donator) a fost sintetizată înainte de conjugare, iar cealaltă a fost sintetizată în celula-receptoare, în timpul transferului cromosomal.

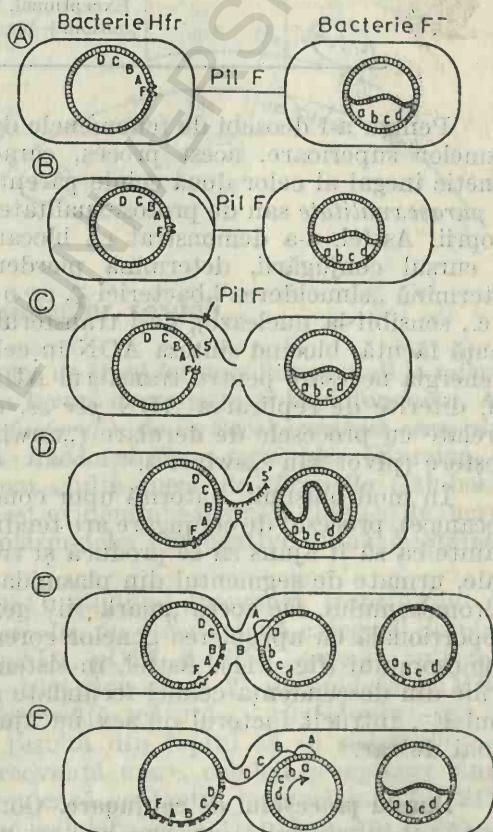
Cercetările efectuate cu precursori marcați cu ¹⁴C și ¹⁵N au demonstrat că ADN este efectiv transferat în formă monocatenară, fără o cantitate semnificativă din citoplasma celulelor-donatoare. Formarea de agregate stabile necesită prezența a cel puțin 3 produși ai genelor *tra D*, *tra I* și *tra M* din structura plasmidei F, în timp ce produșii genelor *tra I* și *tra M* au și un rol activ, regulator, în amorsarea transferului de ADN (Achtman, 1978). Cei mai mulți cercetători consideră că transferul este un proces corelat cu replicarea cromosomului Hfr, în care donatorul este un factor activ, iar bacteria receptoare ar fi pasivă. Cinetica procesului de transfer poate fi urmărită prin întreruperea procesului de conjugare la intervale diferite, fie prin agitarea violentă a celulelor, pentru a le separa mecanic, fie prin tratarea culturii cu un fag, la care bacteria donor este sensibilă, iar receptorul nu. În ambele cazuri, dacă nu a fost realizat integral, transferul cromosomului este oprit (Susman, 1970). O dovadă o constituie faptul că, în general, în prezența inhibitorilor sintezei de ADN, transferul de material genetic este împiedicat.

Există însă și unele date recente contradictorii. În anumite cazuri, transferul ADN poate avea loc chiar în absența replicării ADN (Achtman, 1978), fapt ce demonstrează că aceasta nu ar reprezenta o necesitate absolută pentru transfer. În orice caz, cele mai multe fapte de observație pledează pentru ideea că transferul necesită ca ambele tipuri de celule (♂ și ♀) să fie metabolice active. Celulele F⁺ înfometate, prin cultivare în medii sărace în nutrienți, formează cupluri de conjugare, dar nu transferă ADN. Sinteza conjugală a ADN are loc chiar dacă bacteriile donator și receptor au fost intens iradiate pentru a bloca replicarea ADN (Green și colab., 1971). Această capacitate de „a nesocoti” leziunile matriței în cursul sintezei de ADN pentru transfer demonstrează că procesul evoluează cu un grad de acuratețe mai mic. Kunz și Glicksman (1983) au demonstrat existența unui grad mare de infidelitate în sinteza de ADN pentru transfer conjugal la *E. coli*. El se manifestă printr-o creștere a ratei de substituiri

de baze (de 300 de ori mai mare per ciclu de replicare conjugală), comparativ cu rata erorilor per ciclu de replicare de ADN vegetativ. Mecanismul acestui proces este necunoscut.

După ce a fost astfel „fecundată”, bacteria receptoare devine pentru scurt timp *merodiploidă* (*merozigot*), adică un zigot parțial diploid, deoarece, pe lângă propriul său genom intact, conține și genele transferate de la donator. Fragmentul de material genetic exogen este apoi parțial sau total integrat în endogenot, prin recombinare genetică: un segment de ADN m.c. provenit de la donator este inserat în cromosomul receptorului, cu excizia unui segment omolog de la acesta (fig. 210). Toate fragmentele de ADN neintegrate sînt degradate și pierdute în diviziunile următoare și, ca ur-

Fig. 210. — Stadiile procesului de conjugare Hfr \times F⁻. A. Formarea perechilor specifice, rezistente la separare prin agitare ușoară și inițierea semnalului de „mobilizare” a cromosomului. B. Retracția pilului F în celula donor. C. Formarea unei „punți” de conjugare; producerea unei breșe monocatenare în structura plasmidei F sau în ADN cromosomal, la nivelul situsului de integrare a plasmidei; eliberarea extremității 5' a ADN m.c., care devine originea transferului. D. Sinteza catenei de ADN complementare, de-a lungul matricei de ADN m.c. în direcția 3' \rightarrow 5', de către ADN polimeraza legată de genomul celulei donatoare. E. Molecula de ADN cromosomal transferată formează o sinapsă și se leagă de porțiunea omologă a cromosomului receptor. F. Continuarea sintezei catenelor complementare în celulele donatoare și receptoare, pentru asigurarea menținerii integrității genetice a bacteriei donatoare și recombinarea genetică în celula receptoare (după Curtiss III, 1969).



mare, celula purtătoare a unui cromosom recombinat dă prin diviziune o clonă haploidă. Determinanții unor caractere noi aduși de exogenot și incluși acum în endogenot se exprimă fenotipic prin apariția unor proprietăți noi la celulele-fiice rezultate prin diviziunea celulei parentale „fecundate”, dar genotipul acestor celule rămîne cu predominanță similar aceluia al celulei receptoare-mamă (tabelul nr. 32).

Tabelul nr. 32

Transferul de material genetic și recombinația în funcție de tipul sexual al bacteriilor conjugante

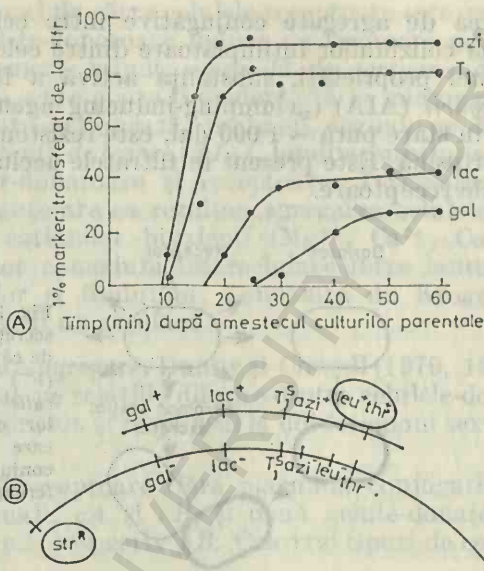
Celule puse în contact	Frecvența recombinației	Natura materialului transferat	Tipul sexual al celulelor progene
$F^- \times F^-$	0	—	F^-
$F^+ \times F^+$	Extrem de mică	Plasmidă de sex	F^+
$F^+ \times F^-$	Mică ($1 \text{ la } 10^5$)	Plasmidă de sex	F^+
$Hfr \times F^-$	Mare ($1 \text{ la } 10^2$)	Fragment de cromosom Excepțional, întregul cromosom + plasmida de sex	F^- Excepțional F^+

Pentru a-l deosebi de fenomenele de sexualitate, caracteristice organismelor superioare, acest proces, caracterizat în esență prin aportul genetic inegal al celor două celule parentale (gameți), a fost numit *proces de parasexualitate* sau de protosexualitate. El are o serie de particularități proprii. Astfel, s-a demonstrat că blocarea sintezei ADN în celula Hfr, în cursul conjugării, determină pierderea viabilității sale (conjugarea determină „sinuciderea” bacteriei ♂, ca o consecință a acumulării de ADN m.c., sensibil la nucleaze), deși transferul de ADN are loc. Aceeași experiență făcută, blocând sinteza ADN în celula ♀, sugerează că mecanismul și energia necesare pentru transferul ADN ar putea fi furnizate și pe alte căi, diferite de replicarea ADN *per se*, ca, de exemplu, de mecanismele corelate cu procesele de derulare („unwinding”) ale ADN, la punctul de creștere (pivotal sau „swivel”).

În mod obișnuit, datorită unor condiții de mediu (în special agitării mecanice), procesul de conjugare are tendința să se întrerupă la întâmplare, înainte ca să fi ajuns să se producă și transferul ultimelor gene cromosomale, urmate de segmentul din plasmida F situat în porțiunea terminală a cromosomului. De aceea „markerii” genetici se transmit cu o frecvență proporțională cu apropierea genelor corespunzătoare de „originea” („O”) cromosomului (fig. 211). Astfel, în sistemul de conjugare $Hfr \times F^-$ bacteriile din descendența celulei fecundate au în marea lor majoritate fenotipul F^- , întrucât factorul de sex nu ajunge să fie transmis decât excepțional de rar.

Durata procesului de conjugare. Contrar a ceea ce ar fi de așteptat, transferul întregului cromosom bacterian necesită o durată de conjugare de circa 90—120 minute. Pentru o bacterie care, la 37°C , se divide în mod normal la fiecare 20—30 minute, durata actului sexual, la aceeași temperatură, depășește aproximativ de patru ori durata normală a ciclului celular. În cazul cromosomului de *E. coli*, alcătuit din $\sim 10^7$ nucleotide, prin puntea de conjugare trec aproximativ 10^5 perechi de baze pe minut, deci cu o viteză de ~ 5 Mdal/minut, ceea ce corespunde unei valori mai mici decât rata replicării (Achtman, 1978).

Fig. 211. — A. Cinetica apariției markerilor cromosomului donator după conjugare, în bacteriile recombinante selecționate pentru caracterele thr^+ , leu^+ . Ordinea markerilor pe cromosomul Hfr este thr^+ , leu^+ , azi , T_1 , lac , gal (thr^+ , leu^+ = capacitatea de a sintetiza treonina și leucina, azi = rezistența sau sensibilitatea la azidă, T_1 = sensibilitatea (S) sau rezistența (R) la fagul T 1, lac , gal = capacitatea sau incapacitatea de a fermenta lactoza). Cu cât genele donatorului intră mai tardiv în celula receptoare, cu atât nivelul platoului curbei este mai coborât, din cauza posibilității mai mari de separare a celor două celule și de rupere a cromosomului (după Jacob și Wollman, 1956). B. Reprezentarea schematică a cromosomului receptorului și a fragmentului de la donator care pătrunde prin conjugare (după Brainbridge, 1980).



Rolul feromonilor sexuali

Existența unor semnale chimice de tipul feromonilor sexuali la microorganisme a fost descrisă inițial la levuri ascomicete și bazidiomicete. Au fost izolați și caracterizați chimic factorul α de la *Saccharomyces cerevisiae* (Sakurai, 1977), *rhodotorucina* la *Rhodospirillum toruloides* (Kamiya și colab., 1979) și *tremrogenii* la mai multe specii de *Tremella* (Ishibashi și colab., 1984). La procariote au fost evidențiate semnale chimice de încrucișare care stimulează transferul plasmidelor conjugative numai la *Streptococcus faecalis* (Clewell, 1981).

Yagi, Brown și Clewell (1981), studiind frecvența transferului de material genetic la *Streptococcus faecalis*, au descris două categorii de plasmide conjugative: 1) plasmidele pAD1, pOB1 și pPD1, care se transferă cu frecvență relativ mare (10^{-3} – 10^{-1} /donor), și 2) plasmidele pAMB1, pAC1 etc., care se transferă cu frecvență scăzută ($\sim 10^{-6}$ /donor). Ei au demonstrat că această diferență rezultă din faptul că în sistemele care transferă materialul genetic cu frecvență mare, celulele-receptoare sintetizează feromoni de sex*, ce stimulează contactul intercelular (fig. 212). Cultivarea în bulion a sistemelor celulare care transferă cu frecvență ridicată este însoțită de biosinteza de către celulele-receptoare a unei substanțe solubile, termostabile, sensibilă la proteaze, ce facilitează for-

* Feromonii sexuali formează o categorie specifică de substanțe cu rol de atracțanți, afrodisiaci sau repelenți, care mediază relațiile sexuale dintre organisme. Fac parte dintr-o categorie generată de substanțe, care, eliminate de un individ în afara corpului său, sunt recepționate de un alt individ, din aceeași specie, în care declanșează o reacție specifică și un comportament diferit.

marea de agregate conjugative între celulele-donatoare și receptor, în urma coliziunilor întâmplătoare dintre cele două tipuri de celule. Pe baza acestei proprietăți, substanța activă a fost numită *agentul inductor al agregării* (AIA) („clumping-inducing agent” CIA). Acest principiu activ are în stare pură ~1 000 dal, este rezistent la tripsină și inactivat de che motripsină. Este prezent în filtratele aceluare ale bulionului de cultură de celule receptoare.

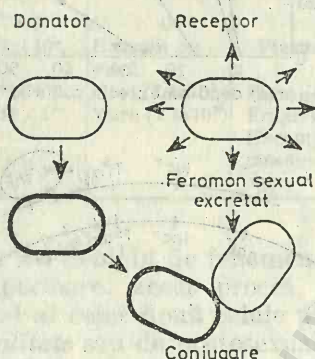


Fig. 212. — Producerea și secreția de feromon sexual de către celulele receptoare (F⁻) de *Streptococcus faecalis* și răspunsul celulelor donatoare (F⁺, Hfr), care conțin o plasmidă conjugativă sensibilă la feromon (după Clewell, 1981).

Suzuki și colab. (1985) au obținut 200 μg de principiu activ purificat din 100 l de mediu lichid în care a fost cultivată o tulpină purtătoare a plasmidei *pPD1* (g.m. ~36 Mdal), care codifică și producerea de bacteriocine. El este un polipeptid mic (g.m. ~912 dal) a cărui secvență de aminoacizi este cunoscută. Este rezistent la tripsină și inactivabil de chemotripsină. Induce procesul de agregare în concentrație de 4×10^{-11} M, respectiv ~4 pg/100 ml. Celulele bacteriene donatoare de material genetic răspund chiar la câteva molecule (Suzuki și colab., 1985).

Adăugat în sistemul donor—receptor, acest principiu determină, pe lângă agregarea masivă, evidentă, a bacteriilor, și mărirea frecvenței de transfer al plasmidelor, cu câteva ordine de mărime.

Clewell și Dunny (1979) au demonstrat că agentul inductor al agregării este un feromon de sex și că răspunsul donatorului la prezența sa în mediu necesită sinteză de proteine și prezența ARN. Celulele receptoare, care prin conjugare dobîndesc o plasmidă conjugativă, își întrerup sinteza endogenă de AIA și devin dependente de feromonul sexual exogen. Dunny, Craig și colab. (1979) au arătat că bacteriile-receptoare produc mai multe tipuri diferite de feromoni și că celulele-donatoare, care poartă plasmide conjugative diferite, răspund la feromoni diferiți. Ceva mai mult, celulele-receptoare care primesc prin conjugare o anumită plasmidă stopează numai producția feromonului corespunzător și continuă să producă alți feromoni, care pot induce alți donori purtători de plasmide conjugative diferite. Clewell (1981) propune identificarea feromonilor prin raportare la plasmida utilizată pentru detectarea lor. Astfel, feromonul *cPD1** are rol de inductor al agregării pentru tulpini care poartă plasmida *pPPD1*.

* c de la engl. clumping = agregare.

Producerea de feromon sexual de către celulele-receptoare este paralelă cu creșterea celulară. Celulele-donatoare induse de feromoni poartă un nou antigen de suprafață amorf, numit *substanță de agregare* (SA), sensibilă la tripsină și la pronază, care poate fi evidențiată la microscopul electronic. Substanța de agregare acționează, probabil, legându-se de o substanță specifică, numită *substanță de legare* (SL) („binding substance”), prezentă pe suprafața celulelor-donatoare și receptoare. Interacțiunea dintre cele două tipuri de substanțe are ca rezultat agregarea celulelor și este condiționată de prezența cationilor bivalenți (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+}). Agregarea explică existența unor conexiuni intercelulare între lanțurile de streptococi, în absența pililor și fimbriilor, semnalată de Krogstad (1980), deși acest aspect ar putea fi un artefact.

Relația plasmide—feromoni—agregare. Dunny și Clewell (1979, 1981) au propus un model general bazat pe relațiile diferite dintre celulele-donatoare și receptoare, cu privire la sinteza și răspunsul la doi feromoni sexuali ipotetici.

Fig. 213 prezintă o celulă-receptoare (fără plasmidă conjugativă), care produce doi feromoni sexuali, *cA* și *cB*, și două celule-donatoare izogene, care poartă plasmidele *pA*, respectiv *pB*. Cele trei tipuri de celule

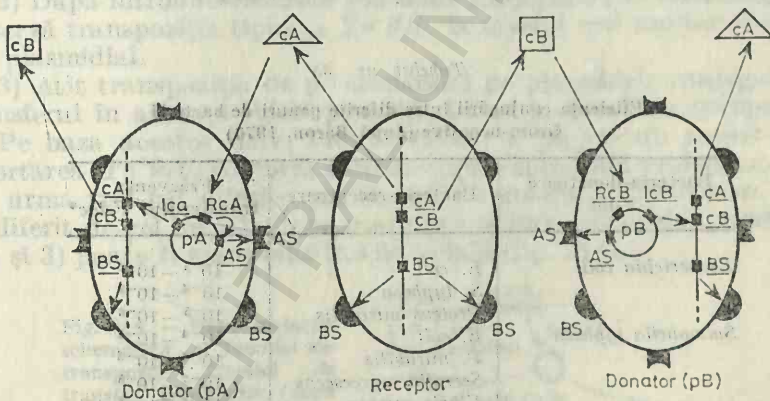


Fig. 213. — Modele reprezentând diferitele relații între bacteriile donatoare și receptoare față de sinteza și răspunsul la doi feromoni sexuali ipotetici *cA* și *cB*. Genele care codifică feromonii sînt situate pe cromosom, împreună cu genele pentru o substanță de legare (BS), care este prezentă atât la celulele donatoare, cât și la cele receptoare și este localizată pe suprafața lor. Genele *IcA* și *IcB*, prezente pe plasmidele *pA* și respectiv *pB*, codifică substanțele care reprezintă sau inactivează *cA* și *cB* endogeni. *RcA* și *RcB* codifică proteinele de reglare (corespunzătoare feromonilor *cA* și *cB*), ce activează gena *AS*, care determină sinteza substanței de agregare (*AS*) localizată, de asemenea, pe suprafața celulei. Când donatorul răspunde feromonului corespunzător, substanța de agregare se leagă de substanța de legare, inițiind contactul conjugal (după Clewell, 1981).

poartă pe suprafață substanța de legare codificată de gene cromosomale. Plasmida *pA* conferă capacitatea de a răspunde la feromonul *cA* și, în același timp, prin acțiunea genei *IcA* împiedică producerea de feromon omolog (*cA*) endogen. În mod similar, plasmida *pB* permite celulei-gazdă să răspundă la feromonul *cB* și împiedică producerea endogenă a acestuia,

prin intermediul genei *IcB*. Răspunsul celulei-donatoare la feromoni este rezultatul unei interacțiuni, directe sau indirecte, cu produsul genelor *RcA*, respectiv *RcB*, care, la rândul său, activează sinteza substratului de agregare (SA), codificată de plasmide sau de gene cromosomale. Pe măsură ce se formează, substanța de agregare se localizează pe suprafața celulelor, unde poate recunoaște substanța de legare. Faptul că o singură celulă-receptoare sintetizează mai mulți feromoni de sex, specifici pentru donatori diferiți (deși probabil nu a întâlnit niciodată plasmidele respective) sugerează că feromonii ar avea și alte funcții în celulele-receptoare, sau că ar fi produși de degradare ai unor proteine inițial mai mari.

Eficiența procesului de conjugare]

Conjugarea, ca și recombinarea genetică ce îi poate urma, se realizează ușor între perechi de celule aparținând aceleiași specii. Frecvența recombinărilor se determină dispersând cultura la sfârșitul conjugării, pe suprafața unor plăci Petri, care conțin mediul ce asigură creșterea genotipului recombinant dorit și nu permite creșterea nici uneia din bacteriile parentale. Numărul celulelor care formează colonii în aceste condiții, divizat la numărul tipului de celule parentale cel mai puțin numeroase în amestecul de conjugare, arată frecvența recombinanților.

Tabelul nr. 33

Eficiența conjugării între diferite genuri de bacterii
Gram-negative (după Baron, 1970)

Bacteria-donatoare <i>F-lac</i>	Bacteria-receptoare	Frecvența transferului <i>F-lac</i> *
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	$10^{-1} - 10^{-3}$
	<i>S. typhosa</i>	$10^{-4} - 10^{-5}$
	<i>Proteus mirabilis</i>	$10^{-5} - 10^{-6}$
<i>Salmonella typhosa</i>	<i>E. coli</i>	$10^{-4} - 10^{-5}$
	<i>P. mirabilis</i>	$10^{-4} - 10^{-5}$
	<i>Serratia marcescens</i>	$10^{-7} - 10^{-8}$
	<i>Vibrio comma</i>	$10^{-4} - 10^{-6}$
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	$10^{-4} - 10^{-6}$
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>	$< 10^{-10}$

* Datele din tabel nu reflectă posibilitatea obținerii de receptori cu frecvență mai mare din populațiile sălbatice de bacterii.

Procesul se realizează cu frecvență mai mică interspecific și chiar intergeneric. În aceste cazuri, deși transferul de material genetic se realizează relativ frecvent, slaba omologie genetică între speciile îndepărtate ca grad de înrudire și prezența endonucleazelor de restricție, care recunosc și degradează moleculele de ADN străin, au ca urmare reducerea marcată sau chiar absența fenomenelor de recombinare genetică (tabelul nr. 33).

Conjugarea indusă de transpozoni

Young și Mayer (1969), precum și Clewell (1981) au descris prezența unor tulpini de *Streptococcus faecalis* și *S. pneumoniae* prezentînd rezistență multiplă la antibiotice, care poate fi transmisă la alte celule, deși celulele-donatoare sînt lipsite de plasmide R. Franke și Clewell (1980, 1981) au demonstrat că la tulpina DS 16 de *S. faecalis* rezistența la tetraciclină este localizată pe un transpozon cromosomal, de ~ 10 Mdal, numit *Tn 916*. De asemenea, două tulpini de *S. pneumoniae* (BM 6001 și N 77), lipsite de plasmide, pot transfera la alte bacterii determinanții de rezistență la clo-ramfenicol și la tetraciclină, în cazul utilizării tehnicilor cu filtre de membrană, cu o frecvență de $\sim 10^{-6}$ /celulă-donatoare (Shoemaker, 1980). Conjugarea în dublu strat de agar mărește frecvența transferului de la 10 pînă la 100 de ori (Smith și Guild, 1980).

Transpozonul *Tn 916* are următoarele funcții :

1) Fiind suficient de mare, poartă informația genetică necesară pentru a determina propriul său transfer la o altă bacterie, cu o frecvență de $\sim 10^{-6}$ — 10^{-8} , în absența unei plasmide cu funcție de conjugon. Transferul necesită un contact direct între celula care poartă transpozonul și celula-receptoare. În cursul acestui proces se transferă întregul *Tn*.

2) După introducerea unor plasmide conjugative în transconjuganți, se observă transpoziția tipică a *Tn 916*, la nivelul mai multor situsuri pe ADN plasmidial.

3) Atît transpoziția de pe cromosom pe plasmidele conjugative, cit și transferul în absența ADN plasmidial sînt procese Rec-independente.

Pe baza acestor date, Clewell (1981) a propus un model privind comportarea *Tn 916*, conform căruia, după excizia din cromosom, acesta poate urma trei căi diferite : 1) se poate reinsera în cromosom, într-un situs diferit de cel inițial ; 2) se poate insera într-o plasmidă rezidentă în celulă și 3) poate fi transferat în altă celulă (fig. 214).

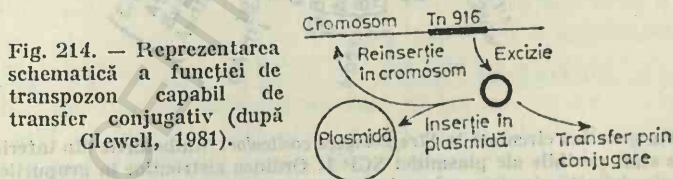


Fig. 214. — Reprezentarea schematică a funcției de transpozon capabil de transfer conjugativ (după Clewell, 1981).

Deoarece transferul se realizează sub forma de ADN n.c. (ca și în cazul plasmidelor), o copie a *Tn 916* rămîne în celula-gazdă (donor), re-inserindu-se în cromosomul acesteia. Inserția este, probabil, facilitată de inducția zigotică a unei integrază (transpozază). Clewell (1981) a propus denumirea de *transpozoni conjugativi* pentru elementele genetice transpozabile cu particularitățile caracteristice *Tn 916*.

„Conjugarea” micelială

Hopwood și colab. (1976) au descris la *Streptomyces*, ca și la alte actinomicete cu morfologie mai complicată, existența unor mecanisme de transfer genetic de tip conjugativ, avînd unele asemănări cu cele carac-

teristice bacteriilor Gram-negative (*E. coli*). Procesul este condiționat de prezența unor factori de fertilitate, detectați ca fiind plasmide de tip conjugativ (Bibb și colab., 1977). El constă în transferul unor fragmente genomice cu dimensiuni diferite (dar totdeauna incomplete), după care poate avea loc recombinarea cu genomul receptor.

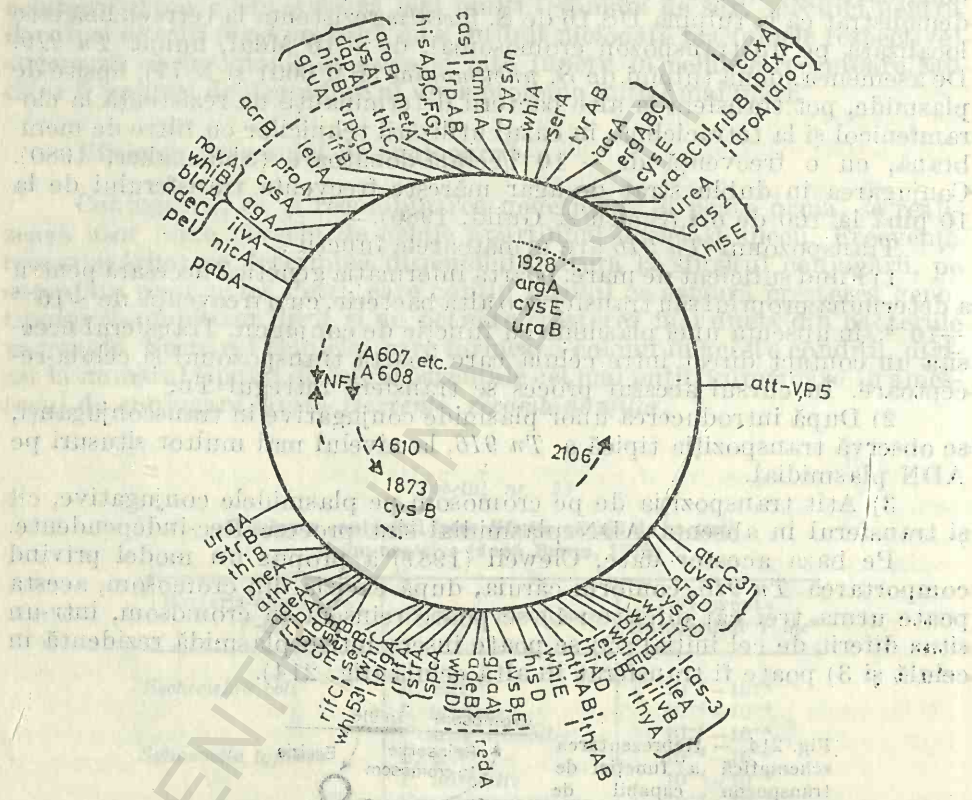


Fig. 215. — Harta genetică circulară la *Streptomyces coelicolor*. Simbolurile din interiorul cercului indică diferitele stări posibile ale plasmidei SCP 1. Ordinea cistronilor în grupurile marcate cu paranteze nu este definită. Poziția celor situați în afara liniilor punctate, față de cei dispuși în interiorul acestora, nu este încă stabilită (după Hopwood, 1976).

Procesul a fost cel mai bine studiat la *Streptomyces coelicolor* A3, de la care a fost izolată și caracterizată plasmida SCP1. Pe lângă funcția de conjugon, aceasta poartă determinanți genetici atât pentru producerea cit și pentru rezistența la antibioticul metilenomicina A (Hopwood și colab., 1976), foarte eficient față de diferite eubacterii și capabil să inhibe formarea de miceliu aerian la celulele de *Streptomyces* lipsite de plasmide (Birge, 1980). Miceliile de *S. coelicolor* A3 pot aparține la patru tipuri de încrucișare diferite: 1) tipul UF („ultrafertilitate”) lipsit de plasmide; 2) tipul IF („initial fertilitate”), care conține plasmida SCP1 în stare autonomă; 3) tipul NF („normal fertilitate”), în care plasmida este integrată în cromozom.

som și 4) *tipul SCP1'* în care plasmida în stare autonomă conține și gene cromosomale (Brooks-Low și Porter, 1978). Aceste tipuri se comportă funcțional ca tipurile F^- , F^+ , Hfr și F' descrise la *E. coli*. O deosebire importantă derivă din faptul că în timp ce la *E. coli* produsul conjugării $Hfr \times F^-$ este practic totdeauna de tip F^- (receptor), la *Streptomyces* recombinanții progeneri ai cuplului $NF \times UF$ sînt totdeauna de tip NF (donor). Sporii lor moștenesc totdeauna plasmida $SCP1$ integrată la un situs specific pe cromosom (situsul NF). Sistemul de transfer este foarte eficient, frecvența sporilor recombinanți obținuți dintr-un amestec de culturi NF și UF fiind practic de 100%. Transferul este bidirecțional și centrat totdeauna pe locusul NF (fig. 215).

Transferul genetic conjugativ și recombinarea genetică consecutivă pot avea loc cu o frecvență mică la unele tulpini de *S. coelicolor* care au pierdut plasmida $SCP1$. El este condiționat în acest caz de prezența unui factor de fertilitate secundar, reprezentat de o plasmidă mică ($\sim 20 \times 10^6$ dal), numită $SCP2$ (Bibb, Freeman și Hopwood, 1977).

Fazele procesului de conjugare micelială, ca și cele ale recombinării genetice consecutive sînt în mare măsură nelămurite. Procesul este dificil de studiat, deoarece fuziunile miceliale sînt greu de urmărit în masa de filamente întreșute (Brooks-Low și Porter, 1978).

Sexducția

Transferul de gene cromosomale bacteriene mediat de plasmidele de sex este numit *sexducție* sau *transducție mediată de plasmidele de sex*. Tipul cel mai mult studiat este cel mediat de plasmida F sau *F-ducția*. Wollman (1956) a presupus că dinții posibilitatea asocierii plasmidelor F cu regiunile cromosomale adiacente în cursul integrării și exciziei lor, iar Jacob și Adelberg (1956) au izolat prima plasmidă *F-lac*, care purta operonul cromosomal *lac*^{*}, pe care îl transmitea celulelor receptoare *lac*⁻. Ulterior, Broda și Scaife (1965) au adus primele probe genetice incontestabile privind incorporarea genelor cromosomale în plasmida F-prim. Lu-crînd cu plasmida F13, au demonstrat, pe de o parte, că aceasta este flancată de aceleași gene cromosomale ca și în bacteriă Hfr în care s-a format, iar, pe de altă, au evidențiat deleția din cromosom a genelor prezente în plasmida F-prim^{*}. Acest tip de bacterii în care printr-o recombinare reciprocă se păstrează atât plasmida F cu gene cromosomale, cît și cromosomul cu deleția corespunzătoare este cunoscut sub denumirea de tulpină *F-prim primară* și exemplifică modelul de integrare și excizie descris de Campbell și aplicabil plasmidelor cu funcții episomale (conversia reversibilă a două structuri circulare într-un cerc) (fig. 216).

Al doilea tip de bacterii F-prim, tulpinile *F-prim secundare*, sînt caracterizate prin faptul că plasmida F-prim conferă diploidie pentru regiunea cromosomală pe care o poartă.

Formarea plasmidelor F-prim. În cazul bacteriilor Hfr, plasmidele F rămin obișnuit integrate, în așa fel încît diviziunile celulare succesive produc un număr important de clone bacteriene Hfr. Ocazional însă, tulpinile Hfr au tendință să revină la starea F⁺, prin reversia plasmidei F, de la starea integrată în cromosomul bacterian, la starea autonomă în citoplasmă, printr-un proces invers celui de integrare.

Ca și în cazul fagului λ , excizia se poate face corect sau eronat. În ultimul caz, are loc un schimb de material genetic între plasmida F și cromosomul bacterian, prin care plasmida încorporează una sau mai multe gene cromosomale, adiacente situsurilor sale de inserție, lăsînd numai uneori în structura cromosomului bacterian un segment de ADN plasmidial. Se formează astfel o unitate de replicare și de transfer numită plasmida *F-prim* (plasmida de sex substituită, Herskowitz, (1977) sau *F-genot* (Rothwell, 1976), în care, uneori, un segment mare de cromosom bacterian a devenit parte integrantă din repliconul reprezentat de plasmida de sex.

* Pentru detalii vezi capitolul „Elementele genetice transpozabile”.

Denumirea de plasmidă *F*-prim a fost utilizată inițial pentru a descrie un factor *F* „alterat”. În prezent „alterarea” este înțeleasă în sensul de plasmidă care poartă informație genetică preluată din cromosom (Brooks-

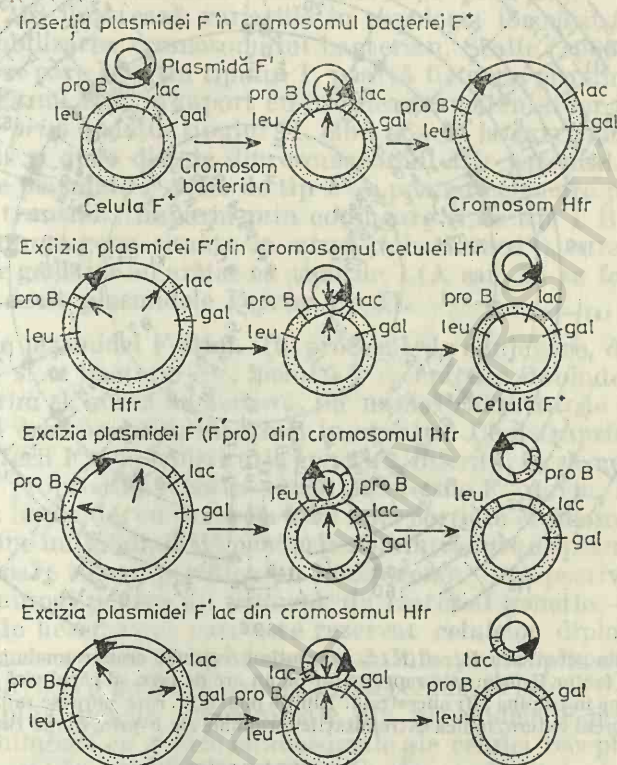
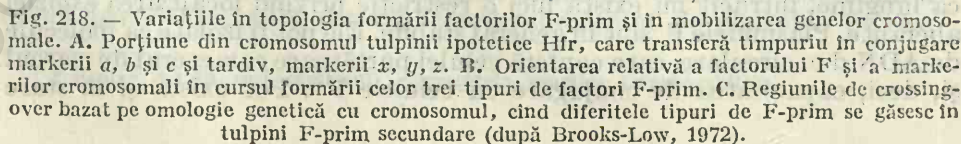
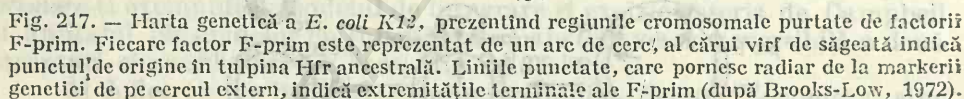


Fig. 216. — Formarea tulpinilor *Hfr*, *F*⁺ și *F*-prim printr-o singură recombinare între cromosomul bacterian și plasmida *F*. A. Formarea tulpinilor *Hfr*. B. Excizia corectă a plasmidei *F* și revenirea la starea *F*⁺. C, D. Excizia eronată cu incorporarea genelor cromosomale *pro B* și respectiv *lac* (după Strickberger, 1976).

Low, 1972). Foarte frecvent, plasmidele *F*-prim conțin toate genele repliconului *F* (deoarece, probabil, deleția unora dintre ele ar duce invariabil la pierderea caracterului de conjugon), la care se adaugă setul de gene cromosomale. Creșterea în lungime nu creează probleme speciale. Deoarece plasmida *F*-prim rămâne autonomă în citoplasmă și nu este încorporată într-o capsidă fagică nu are limite de mărime și poate ajunge la dimensiuni echivalente cu 25% din genomul *E. coli* (fig. 217).

Deoarece plasmidele *F* se pot integra într-un număr mare de situsuri cromosomale, diferitele tulpini *Hfr* vor da naștere unor plasmide *F*-prim, care vor purta seturi de gene diferite, adiacente acestor situsuri, dar variate ca lungime, întrucât nu există nici o restricție privind localizarea exciziei aberante. Plasmidele *F*' sînt în general stabile. Ele pot fi izolate ca molecule de ADN d.c. circulare, care conferă celei purtătoare caracterul de mascul și, deci, capacitatea de conjugare cu celulele *F*⁻. Pot exista și în stare



integrată, în care sînt greu de menținut și de deosebit de tulpinile Hfr propriu-zise. Plasmidele *F*-prim sînt denumite fie cu simbolul cistronului cu caracter de marker genetic pe care îl poartă (spre exemplu, *F*-prim-lac), fie cu un număr atribuit convențional (*F*-prim 25).

Figura 218 ilustrează variațiile în topologia formării factorului *F*-prim și în mobilizarea cromosomului bacterian. Scaife (1966) a arătat că factorii *F*-prim care aparțin tipului I, poartă fie gene proximale, fie gene distale ale regiunii Hfr, în raport cu ordinea transferului lor în conjugare. Plasmidele *F*-prim aparțin tipului II, cînd poartă la extremități atît gene proximale, cît și gene distale din cromosomul Hfr parental. El propune denumirea de plasmide *F*-prim de tip I A pentru cele care poartă numai gene care se transmit timpuriu prin conjugare și de tip I B pentru cele care poartă numai gene situate în urmă („backsided”), care se transferă tirziu. Studiile genetice au arătat că tipurile I (A sau B) se formează mult mai frecvent decît plasmidele *F*-prim tip II.

Funcțiile plasmidei *F*-prim. În procesul de conjugare, dintre o plasmidă *F*-prim și o bacterie *F*⁻, celula ♀ receptoare dobindește întreaga plasmidă *F*-prim și, odată cu aceasta, nu numai calitatea de mascul, ci și determinanții cromosomali, integrați în aceasta. Cînd transferul se efectuează la bacterii *F*⁻ cu constituție genetică diferită, el se manifestă prin apariția unor proprietăți fenotipice noi. Bacteriile *F*⁻ devin, la rîndul lor, *F*-prim și sînt haploide, cu excepția unei mici porțiuni cromosomale, în care o regiune devine inițial diploidă pentru genele introduse de plasmida *F*-prim. Celula receptoare se comportă ca un heterogenot — respectiv ca o celulă heterozigotă numai pentru un segment de material genetic — în opoziție cu termenul de heterozigot care este rezervat celulelor diploide (Levine, 1974). Ca urmare a unor cicluri repetate de infecție și replicare, plasmidele *F*-prim pot converti o întreagă populație bacteriană în celule *F*-prim parțial diploide. În plus, genele cromosomale din plasmidele *F*-prim participă adeseori la schimburi cu genele cromosomale ale celulei receptoare pentru a produce recombinanți adevărați (proces de sexducție). Locul lor de integrare preferat este reprezentat de unul din determinanții genetici de proveniență bacteriană pe care îi poartă plasmida *F*-prim. După ce recombinarea s-a produs, cromosomul bacterian poartă două copii ale genelor bacteriene prezente în structura plasmidei *F*-prim. Bacteriile *F*-prim reprezintă un tip nou de celule, care posedă atît caracter *F*⁺, cît și caracter Hfr. Din aceasta decurge și denumirea lor de *masculi intermediari*. Caracterul *F*⁺ decurge din capacitatea lor de a transfera prin conjugare plasmida *F*, iar asemănarea cu bacteriile Hfr rezidă în marea frecvență cu care se produce recombinarea genelor cromosomale transferate cu plasmida de sex.

Fenomenul este similar transducției fagice și de aceea este denumit de unii autori *transducție prin plasmide de sex*. Deoarece prin sexducție se transferă segmente de cromosomi (variînd între ~10 și 25% la *E. coli*), adiacente situsurilor de integrare ale plasmidei *F*, procesul este similar transducției specializate efectuată de fagii λ. În contrast cu procesul de sexducție, în conjugarea bacteriilor Hfr, plasmida *F* se comportă funcțional asemănător unui fag de transducție generalizată, deoarece mobilizează întregul cromosom bacterian.

Transducția fagică

(Pl. 23)

Transducția fagică este procesul prin care un fragment de cromosom bacterian este transferat de la o celulă bacteriană la alta, prin intermediul capsidului anumitor fagi temperați.

Zinder și Lederberg (1952) au demonstrat că anumiți fagi temperați pot acționa ca vectori în transferul de gene bacteriene de la o linie celulară la alta. Fenomenul a fost observat inițial în amestecul a două tulpini de *Salmonella typhimurium*, având caractere auxotrofe diferite, din care s-au izolat bacterii prototrofe. Ei au arătat că transferul de material genetic nu necesită contactul direct între cele două tipuri de bacterii și că este condiționat de prezența fagului temperat P 22, pentru care una din cele două tulpini era lizogenă. Ulterior, Lederberg și Lederberg (1953) au descris unele proprietăți ale fagului λ , care lizogenizează celulele de *E. coli*

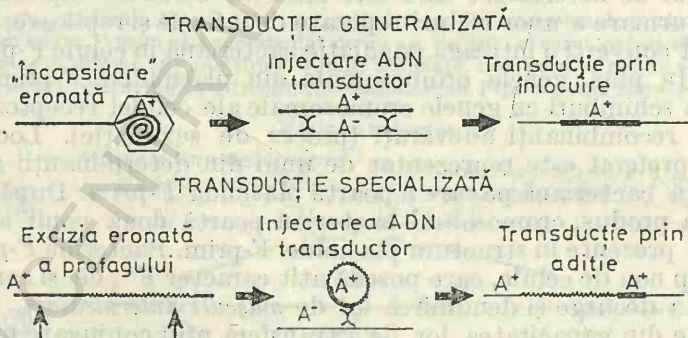


Fig. 219. — Mecanismele transducției fagice generalizate și specializate (după Echols, 1977).

K 12 și, împreună cu Morse (1954, 1956), au semnalat capacitatea acestuia de a transfera gene bacteriene. Transferul poate fi urmat de integrarea cromosomală a fragmentului transferat sau de formarea unei entități genetice autonome în celula-receptoare, asemănătoare plasmidelor (Brooks — Low și Porter, 1978). Transducția este un proces anormal, în sensul că transferul genelor bacteriene este realizat prin intermediul unei structuri — capsida fagului — care a evoluat, în primul rând, pentru a proteja și transporta genomul viral ce poartă informația genetică necesară pentru sinteza

ei. În funcție de structura genetică a fagilor transductori și de mecanismul de formare a materialului genetic al particulei fagice transductoare au fost descrise două tipuri de transducție fagică : *transducția specializată* și *transducția generalizată* (fig. 219).

Transducția fagică specializată

Cunoscută și sub denumirea de *transducție restrictivă* sau *localizată*, transducția fagică specializată este caracteristică unor fagi transductori (λ , Φ 80 etc.) care au proprietatea de a transfera eficient numai un număr restrâns de gene bacteriene, situate în imediata apropiere a situsului de legare a profagului, în cromosomul bacterian. Ea este cel mai bine cunoscută în cazul fagului lambda, care infectează celula-gazdă *E. coli* K 12, după fixarea pe o structură membranară legată fizic și genetic de situsurile de transport ale maltozei. Tulpinile mutante *mal*⁻ sînt deficiente în transportul maltozei și rezistente la infecția cu fagul λ . Spre deosebire de infecția litică, care implică exprimarea totală a informației genetice fagice, replicarea și morfogeneza fagului urmată de liza bacteriilor, *evoluția lizogenă*, în care celula bacteriană supraviețuiește, reprezintă condiția esențială a transducției genetice specializate*.

Mecanismul molecular al formării fagilor de transducție specializată

Conversia moleculei de ADN genomic al fagului λ de la forma lineară în care există în particula virală infecțioasă la stadiul de provirus integrat în cromosomul *E. coli* este reprezentată schematic în fig. 220.

Genomul λ în forma prezentă în virion este alcătuit dintr-o moleculă de ADN d.h. linear, cu o lungime de 47 500 pb, avînd la extremitățile 5' ale celor două catene polinucleotidice secvențe complementare monocatenare, formate din cîte 12 nucleotide (*secvențele coezive* sau *adezive*). Circularizarea ADN λ se realizează în toate celulele infectate, deoarece reprezintă o condiție obligatorie prealabilă atît pentru replicare, cît și pentru integrarea ADN. Ea se face prin reunirea și legarea covalentă a extremităților adezive.

În celulele destinate să supraviețuiască (*evoluția lizogenă*), în etapa următoare, genomul λ este inserat în continuitatea cromosomului bacterian, pentru a forma un genom nou, cu ~1% mai lung decît cel inițial rezultat din recombinarea ADN fagic cu ADN bacterian. În această stare, informația genetică virală este transmisă odată cu cea cromosomală bacteriană, la toți descendenții celulei, la fiecare diviziune. În celulele lizogene, aproape toate genele profagului inserat sînt represate de o proteină virală, produs al genei *cI*. Profagul λ are o localizare genetică definită la *E. coli*, între operonii *gal* și *bio*. Dovada o constituie faptul că în experiențele de conjugare distanța dintre cei doi markeri genetici este mărită corespunzător. Distanța dintre genele *gal* și *bio* devine și mai mare cînd se integrează doi profagi în tandem, respectiv cînd extremitățile adezive a două geno-

* Structura genetică, evoluția infecției litice și lizogene a fagului λ sînt descrise în detaliu în *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 231.

muri fagice se reunește pentru a forma o moleculă circulară. Tulpinile bacteriene care conțin doi profagi legați în tandem se numesc *dublu lizogene*. Integrarea profagului lambda are totdeauna o orientare specifică.

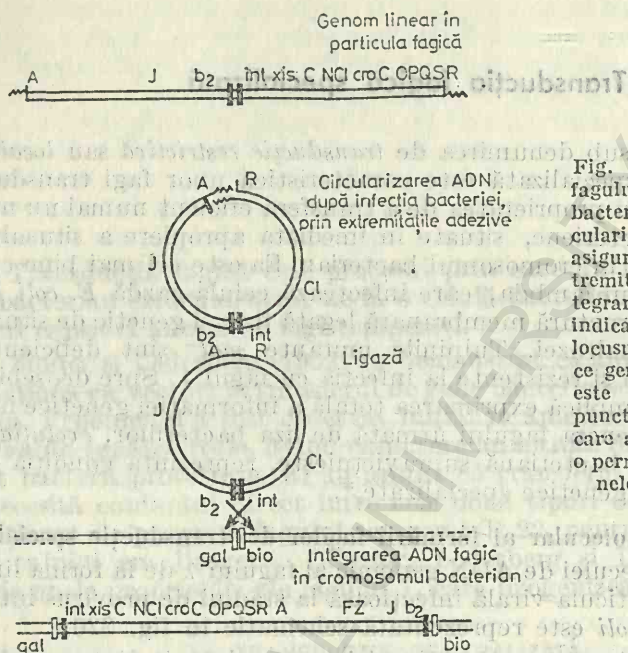


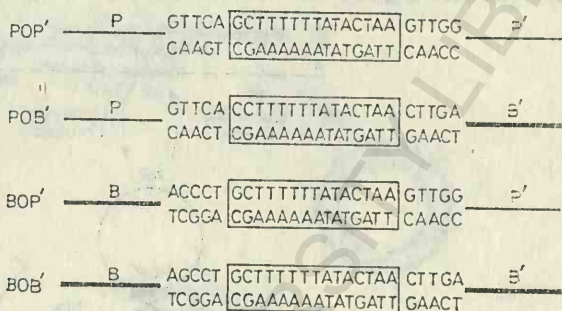
Fig. 220. — Integrarea fagului λ în cromosomul bacteriei *E. coli*, după circularizarea genomului său, asigurată de existența extremităților „adezive”. Integrarea se face în sensul indicat de săgeți (între locusurile *gal* și *bio*, după ce genomul fagic circular este „deschis” într-un punct diferit de cel în care a fost închis. Rezultă o permutare circulară a genelor după integrare.

Integrarea este favorizată de faptul că atât genomul λ , cât și cromosomul bacterian poartă situsuri specifice de legare, *att* („*attachement site*”). Atât situsul de legare bacterian *att* *B*, cât și cel fagic *att* *P* sunt alcătuite din două subsitusuri B, B', respectiv P, P', separate de o regiune mediană „O”, lungă de 15 perechi de baze, a căror secvență este cunoscută și care reprezintă zona de omologie genetică între fagul λ și bacteria *E. coli*. În cazurile în care situsul de legare normal al fagului λ a fost îndepărtat prin deleție din cromosomul bacterian, frecvența formării de bacterii lizogene scade de câteva sute de ori, dar nu este suprimată complet. Fagul λ se poate integra mult mai rar ca profag, la situsuri secundare adiționale, distribuite la întâmplare de-a lungul genomului. În momentul inducției, fiecare situs nou creează posibilitatea obținerii unor fagi de transducție specializată, deosebiți în funcție de natura cistronilor bacterieni care flanchează profagul.

Fig. 221 prezintă secvența de baze a situsurilor, care determină interacțiunea dintre ADN bacterian și fagic, stabilită cu ajutorul a patru fagi de transducție specializată ca sursă de ADN (Landy și Ross, 1975). Cele patru secvențe sunt correlate astfel: 1) toate au în comun o secvență de 15 pb situată la punctul de crossingover, reprezentând secvența de omologie genetică „O”; 2) la stînga celor 15 baze, secvența λ *gal* este identică cu secvența bacteriană determinată în fagul λ *gal bio*; la dreapta, secvența

λ gal este identică cu λ ; 3) ADN λ bio are o situație exact inversă față de λ gal; ADN fagic este situat la stînga celor 15 baze comune, iar ADN bacterian la dreapta. În concluzie, secvențele sînt exact cele scontate teo-

Fig. 221. — Secvența bazelor în situsul de inserție al fagului λ . Cele patru secvențe au un segment de 15 baze comun (în chenar) în punctul de crossingover. Sînt prezentate numai cîte 5 baze din fiecare secvență, care flanchează regiunea de omologie (O), restul secvenței fiind indicat prin linii notate P, P', B, B'; POP' — situs de inserție fagic; BOB' — situs de inserție bacterian; POB' — situs de inserție hibrid cu ADN fagic la stînga și ADN bacterian la dreapta; BOP' — situs de inserție hibrid cu ADN bacterian la stînga și ADN fagic a dreapta (după Campbell, 1979).



retic, în cazul în care inserția și excizia s-ar produce prin crossingover la nivelul segmentului de 15 pb. Datele experimentale arată că lungimea de 15 pb corespunzînd regiunii „O” a situsurilor *att* nu este suficientă pentru o integrare eficientă și atribuie un rol important regiunilor neomologe, care flanchează pe ambele părți regiunea omologă de crossingover, atît în *att B* care are ~25 pb, cit și în *att P*, avînd ~317 pb (Arber, 1979).

După modelul lui Campbell (1977), procesul de integrare se realizează prin legarea jumătății stîngi a regiunii *att B*, cu jumătatea dreaptă a regiunii de legare fagice (*att P'*), determinînd într-o primă fază formarea unei structuri asemănătoare cifrei 8. Cînd această structură se depliază, se formează o moleculă circulară mare, care poartă genomul fagului lambda integrat ca profag (fig. 222). Datorită acestui mecanism, ordinea genelor în profagul linear este diferită de cea prezentă în genomul fagic vegetativ circular. Deoarece situsul de legare *att P* folosit pentru integrarea fagului în genomul bacterian este situat între genele *J* și *N*, acestea devin diferite situate în raport cu extremitățile adezive ale ADN fagic care sînt adiacente genelor *A* și *R* (fig. 223).

Integrarea este rezultatul unei recombinări genetice de tip special numită *recombinare integrativă* (Shapiro, 1977) sau *recombinare la situsuri specifice*. Faptul că inserția fagului λ are loc și în bacterii *rec⁻*, infectate cu fagi *red⁻*, demonstrează independența acestui proces față de genele *rec B* și *red fagice*, care condiționează recombinarea generală (legitimă sau omologă). Recombinarea integrativă necesită prezența proteinei virale *integraza (recombinaza)*, cu g.m. ~140 000 dal, produs al cistronului *int* și a două proteine bacteriene codificate de genele *hip* și *him* (Williams și colab., 1977). Mutantele fagice cu cistronul *int* nefuncțional sînt defective atît în capacitatea lor de integrare, cit și în cea de excizie. Recombinarea poate avea loc fie prin secționarea celor două genomuri, la nivelul unor nucleotide specifice în regiunea celor 15 pb omologe, producînd molecule „tăiate drept” („blunt ended”), care apoi sînt reunite, fie, mai

probabil, prin secționarea lor decalată („staggered”) față de axul regiunii printr-un mecanism similar celui care funcționează în cursul replicării ADN λ (fig. 224). În acest caz, are loc formarea de extremități coezive (adezive), complementare atât în genomul fagic, cât și în cel bacterian, care permit legarea lor încrucișată și integrarea profagului.

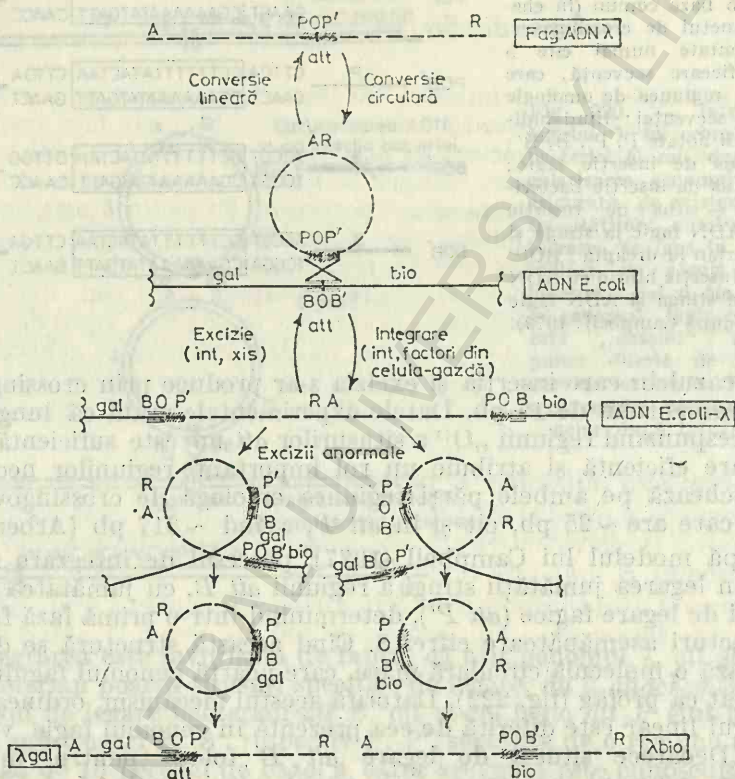


Fig. 222. — Bazele moleculare ale fenomenului de inserție și excizie a fagului λ . Schema prezintă detalii asupra interacțiunilor dintre genomul fagic și cromosomul bacterian, la nivelul situsurilor de legare (att) respective, în procesul de integrare, excizie corectă sau eronată și asupra enzimelor ce le realizează.

Profagul se comportă ca orice genă cromosomală, în sensul că se replică cu aceeași viteză ca și genele bacteriene (pe baza moleculă pentru moleculă) și, ca și acestea, ocupă o poziție definită pe harta genetică (cistronii virali pot fi cartăți ca și cei bacterieni). El este repartizat, ca și genele cromosomale, prin segregare în celulele-surori, la sfârșitul fiecărei diviziuni celulare. Singura deosebire rezultă din faptul că o mare parte din informația genetică fagică, corespunzând proteinelor specifice virale (în special celor tardive), nu se poate exprima. Ca urmare, în celula bacteriană infectată cu un profag nu se asamblează particule fagice noi și celula-gazdă nu este lizată. Această comportare este determinată de prezența în celula lizogenă a unei *proteine-represor* $\sim 27\,000$ dal), produs al

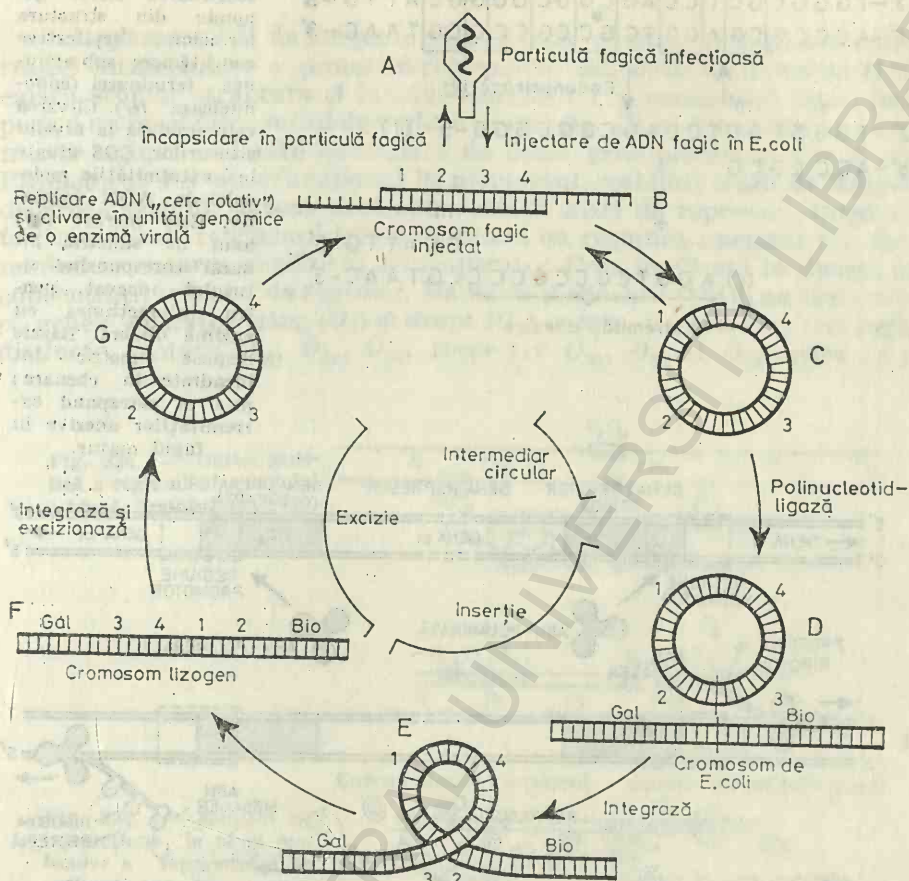
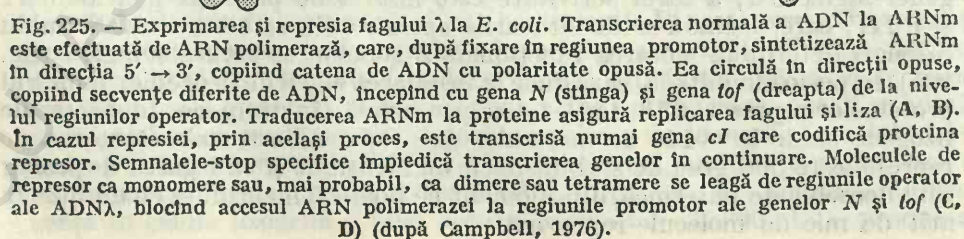
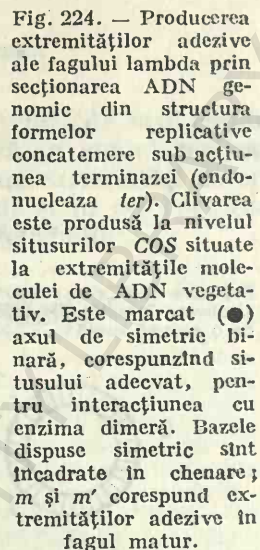


Fig. 223. — Inserția și excizia ADN λ în cromosomul bacterian. A. Fagul λ injectează ADN d.c. linear cu extremități „adezive” (B), care se circularizează în celula bacteriană (C). Polinucleotid ligaza bacteriană închide cele două breșe monocatenare din structura genomului λ (D). Intermediarul circular λ interacționează cu cromosomul bacterian între genele *gal* și *bio*. Genomurile viral și bacterian sînt rupte și reunite la un situs unic al fiecăruia sub acțiunea integrazii virale; ADN fagic este integrat în cromosomul bacterian. Ordinea genelor virale este: 3, 4, 1, 2, respectiv permutarea ordinii virale normale 1, 2, 3, 4 (E). Cromosomul *E. coli* este lizogen pentru fagul λ (F). În cazul inducției litice, excizionaza și integrază virală asigură excizia ADN λ și conversia lui circulară cu revenire la ordinea originală a genelor (G). Replicarea genomului λ și clivarea lui specifică de o enzimă virală asigură formarea de extremități adezive înainte de împachetarea în alte capside fagice (după Campbell, 1976).

genelor fagice *c I*, a cărei activitate este mărită de producția genelor *c II* și *c III*, care, legându-se de situsurile *operator* din structura ADN dublu catenar, determină blocarea funcțională a genelor structurale fagice (fig. 225). În perioada inițială, care duce la instalarea stării de lizogenie, numărul proteinelor-represor este de ~ 1400 per celulă, în timp ce în bacteriile lizogene scade la ~ 140 de molecule. Aceasta demonstrează că starea de represie este mai greu de stabilit decît de menținut și că legarea de profag este deosebit de puternică, din moment ce poate fi menținută cu un număr atît de mic de molecule-represor.



Reglarea stării de lizogenie. Explicația acestor variații ale concentrației intracelulare a proteinei-represor a fost dată de Ptashne (1976), care a studiat structura și funcția regiunii *cI* a genomului fagic, descoperind un mecanism subtil de reglare a acesteia. El a demonstrat că exprimarea regiunii *cI* este controlată de două gene promotor *Pre* și *Prm*. Promotorul *Pre* este funcțional în momentul stabilirii stării de lizogenie, deoarece asigură sinteza unei concentrații mari de represor. După ce a fost sintetizat, represorul interacționează cu regiunea operator O_R , determinând comutarea reglării la gena operator *Prm*, implicată în sinteza unei concentrații scăzute de represor. Maniatis și Ptashne (1976) au demonstrat că genele operator sting (O_L) și drept (O_R) conțin, fiecare, câte trei regiuni distincte, notate O_{L1} , O_{L2} , O_{L3} , respectiv O_{R1} , O_{R2} și O_{R3} , care se pot

Fig. 226. — Harta genetică a regiunii *cI* a fagului λ (după Brainbridge, 1980)

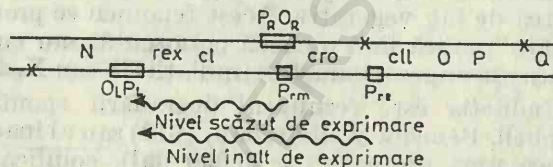
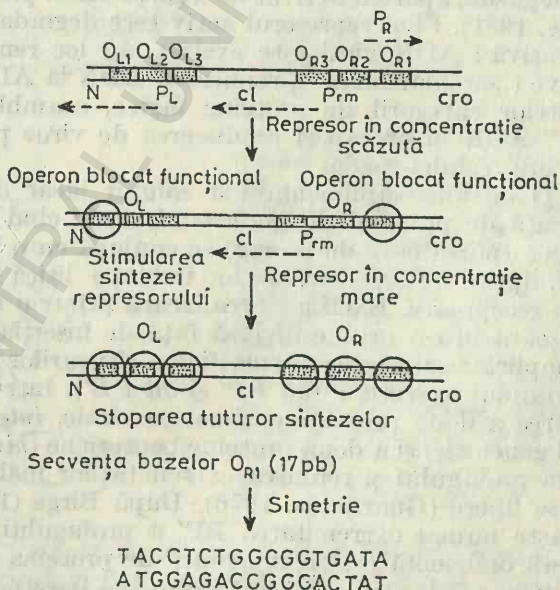


Fig. 227. — Modelul de interacțiune la nivel molecular a represorului cu regiunea operator cromosomală (A) și secvența bazelor în regiunea O_{R1} (B) (după Maniatis și Ptashne, 1976).



combina cu proteinele-represor. Regiunile O_{R1} și O_{L1} au afinitatea cea mai mare pentru represor și, ca urmare, atunci cînd represorul se găsește în cantitate mică se combină preferențial cu aceste regiuni. Mascarea regiunilor O_{R1} și O_{L1} prin legarea represorului are ca rezultat blocarea sintezei tuturor produșilor genelor, cu excepția produsului genei *cI* (proteina-represor) format sub controlul promotorului *Prm*. (fig. 226 și 227). În mod surprinzător, represorul poate acționa ca propriul său inductor, pe mă-

sură ce activitatea Prm este mărită prin interacțiunea dintre represorul format și regiunea O_{R1} . La concentrații mari de represor sînt mascate și regiunile O_{R2} și O_{R3} , ca și cele O_{L2} și O_{L3} , fapt care duce la stoparea tuturor sintezelor (inclusiv a proteinei-represor).

Analiza fiecărei regiuni operator a demonstrat, în toate cazurile, existența unei structuri similare, care explică posibilitatea interacțiunilor dintre represor și molecula de ADN. Aceste structuri, avînd un ax de simetrie binară, conțin secvențe de nucleotide de tip palindromic, care pot fi citite în direcția $5' \rightarrow 3'$ a moleculei de ADN în mod similar, deși nu identic. Se consideră că, dacă represorul este un dimer, fiecare subunitate poate recunoaște o jumătate din secvența operator.

Inducția litică. Producerea de fagi transductori. Din cînd în cînd, unele bacterii lizogene produc fag matur, ca rezultat al trecerii profagului în starea de fag vegetativ. Acest fenomen se produce cu o frecvență mică „spontan”, adică fără o cauză cunoscută, sau cu o frecvență mărită, sub acțiunea unor agenți inductori (radiații UV sau X, diferiți agenți chimici etc.).

Inducția este rezultatul degradării spontane a proteinei-represor (Campbell, Benedik și Heffernan, 1979) sau al inactivării ei enzimatică, sub acțiunea unei proteaze ($\sim 40\,000$ dal), codificată de cistronul *rec A* al celulei-gazdă, aparent activat de legarea ADN produsă de agentul inductor (Birge, 1981). Cînd represorul activ este degradat, profagul intră în stare vegetativă: ADN viral este excizat, au loc reunirea extremităților sale adezive („circularizarea”), replicarea ADN la ADN concatemer, formarea diferitelor categorii de proteine fagice, asamblarea fagului, „împachetarea” ADN în precap și producerea de virus progen, care este eliberat prin liza celulei-gazdă.

O dovadă suplimentară a rolului jucat de proteina-represor este furnizată de procesul de *inducție zigotică*: cînd o celulă bacteriană Hfr lizogenă (purtaătoare de profag) se conjugă cu o bacterie normală (nelizogenă), lipsită de represor, are loc inducția litică imediată și inevitabilă în celula-receptoare. Excizia se realizează printr-o serie de evenimente ce se desfășoară într-o ordine inversă față de inserția cromosomală a fagului. Ele implică recunoașterea specifică a situsurilor de legare a profagului în cromosomul bacterian (*att BP'* și *att PB'*), într-o reacție ce necesită participarea a două proteine enzimatică virale, *integraza* și *excizionaza* (produsul genei *xis*) și a două proteine bacteriene (*him* și *hip*), care determină excizia profagului și reunirea extremităților moleculei de ADN bacterian rămase libere (Guarneros, 1976). După Birge (1981), integraza poate recunoaște numai extremitatea *BP'* a profagului, nu însă și situsul *PB'*. Această deficiență este compensată de proteina *xis*.

Cu o frecvență mică, aproximativ o dată la un milion de celule, excizia corectă este înlocuită de o excizie eronată. Procesul de rupere și reunire a ADN are loc în regiuni diferite, de-a lungul cromosomului bacterian. Se formează un genom hibrid fagobacterian, care conține o parte din informația genetică bacteriană, adiacentă locului de inserție al profagului și din care lipsește o parte din ADN viral, de la extremitatea opusă a profagului. Cînd această moleculă este replicată și informația sa genetică este transcrisă și tradusă la proteine rezultă o particulă virală — fagul transductor — în care o parte din ADN fagic este înlocuit cu ADN bacterian.

Cînd acești fagi infectează o nouă celulă bacteriană, îi transmit proprietățile noi preluate din genomul bacteriei-donatoare. Experimental s-a demonstrat că inducția ciclului litic prin expunerea bacteriilor lizogene (λ^+) la radiații ultraviolete are drept urmare transducția, spre exemplu, a markerului gal^+ cu o frecvență de 1 la un milion. Procesul este cunoscut sub denumirea de *transducție cu frecvență joasă* („low frequency transduction”). Coloniile bacteriene obținute sînt (fig. 228) formate din bacterii hetero-

Fig. 228. — Mecanismul transducției genelor gal^+ de către fagul λ (după Brainbridge, 1980).

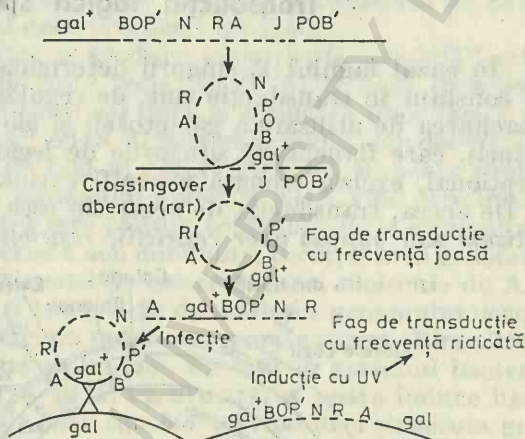
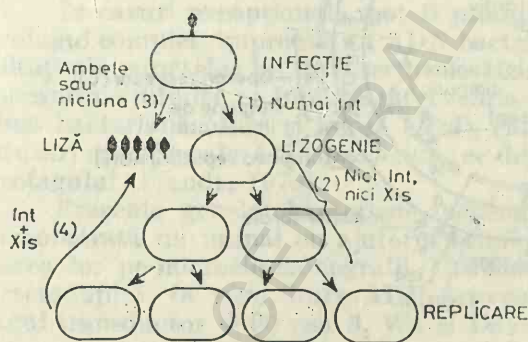


Fig. 229. — „Ciclul de viață” al fagulii lambda, prezentînd stadiile în care producerea de integrază (Int) sau de excizionază (Xis) reprezintă un avantaj în cadrul ciclului. Stadiul 1 este prezent în celulele care supraviețuiesc datorită instalării stării de lizogenie; stadiul 2 corespunde creșterii și diviziunii bacteriilor lizogene; stadiul 3 apare la celulele infectate, care se lizează și eliberează fagi pkogeni. Stadiul 4 are loc în celulele lizogene în care represorul este inactivat, accidental sau deliberat (după Campbell, 1979).



zigote, avînd genotipul $gal^-/\lambda-gal^+$. Dacă aceste bacterii sînt supuse din nou inducției cu UV, se obțin fagi care transduc cu o frecvență mult mai mare („high frequency transduction”). Faptul că inserția și excizia propagulii au necesități enzimatice diferite face posibil ca virusul să controleze nu numai gradul, ci și direcția reacției.

Fig. 229 prezintă patru etape din „ciclul de viață” al fagulii temperat, în care acesta poate controla avantajos pentru evoluția sa diferitele reacții. Astfel, infecția litică a *E. coli* nu necesită nici proteina *int*, nici proteina *xis*. Prezența integrazee singurǎ ar fi dăunătoare, pentru că ar lega ADN fagic de cromosomul bacterian, împiedicînd asamblarea. Instalarea stării

fagilor transductori au arătat existența unei pierderi de ADN fagic, în raport cu cantitatea de ADN bacterian purtat de particula transductoare. Pierderea de ADN viral determină caracterul defectiv (notat cu *d*) al fagilor transductori și prin aceasta pierderea unor funcții virale. Natura caracterului defectiv este corelată cu poziția genelor respective pe harta genetică a fagului (fig. 230). Astfel, fagul $\lambda d gal^+$ este defectiv în funcția de replicare a ADN, în timp ce fagul $\lambda d bio^+$ este defectiv în sinteza proteinelor structurale. Deoarece genele *gal* sînt mai îndepărtate de situsul λatt , fagii λgal sînt mult mai defectivi decît cei λbio .

S-a demonstrat că pentru a produce o particulă „viabilă” există anumite limitări în ceea ce privește regiunile de ADN fagic care pot fi pierdute. Astfel, pierderea situsului *cos* duce la formarea unor fagi λdoc , care nu-și mai pot „împacheta” ADN în particula fagică, iar deleția situsului *ori* determină apariția de fagi al căror ADN nu se poate replica. Examinarea hărții genetice a profagului arată că ADN viral care lipsește din genomul fagului transductor este pierdut totdeauna de la extremitatea profagului opusă genelor bacteriene nou dobîndite. Incorporarea genomului în capsidul fagice este condiționată de existența unei molecule de ADN cu o mărime variind între 75 și 109% față de mărimea genomului normal. Moleculele mai mari sau mai mici nu pot fi încorporate corect (Birge, 1981). În unele cazuri, fagul transductor λ nu lasă în genomul bacterian gene esențiale pentru replicarea sa și, ca urmare, el poate induce liza și transfera, în același timp genele gal^+ sau bio^+ , avînd deci structura genetică $\lambda p gal^+$ sau $\lambda p bio^+$, în care *p* indică proprietatea de a produce plaje de liză.

În cazuri excepționale, pot fi produși fagi transductori care conțin profagul complet, împreună cu ADN bacterian, derivat de la ambele extremități ale punctelor lui de inserție. Excizia acestor fagi se realizează prin mecanisme diferite ce implică intervenția sistemelor de recombinare legitimă bacteriană (*Rec*) și fagică (*Red*), care acționează la nivelul a două situsuri specifice ale ADN bacterian, ce depășesc, de fiecare parte, limitele profagului (Fiandt, 1976).

Prezența genelor bacteriene în genomul fagilor transductori a fost demonstrată nu numai cu ajutorul tehnicilor genetice, ci și prin evidențierea lor pe microelectronografii. Utilizînd tehnica formării de molecule heteroduplex *in vitro*, între ADN provenit de la fagul parental $\Phi 80$ și fagul transductor $\Phi 80$ *psu 3*, Wu și Davidson (1976) au pus în evidență formarea de regiuni dublu catenare, de-a lungul celei mai mari părți a celor două molecule, datorită complementarității secvențelor nucleotidice componente. Fac excepție o regiune lungă de ~3 000 de nucleotide purtată de fagul transductor, corespunzînd determinantilor genetici proveniți din cromosomul *E. coli*, și o regiune de ~2 000 de nucleotide din genomul viral, prezentă în genomul fagului, normal $\Phi 80$, înlocuită cu gene bacteriene în fagul transductor $\Phi 80$ *psu 3*. Din cauza lipsei de complementaritate, cele două secvențe nu pot forma perechi de baze și rămîn monocatenare. Ele apar pe microelectronografii sub forma unor anse monocatenare, numite bucle de substituție (Campbell, 1976).

Evoluția infecției cu fagi transductori. Eliberarea fagilor transductori (în general incapabili de replicare și de liză a celei-gazdă) se reali-

zează cu ajutorul particulelor fagice normale, prezente în număr mare, care acționând ca fagi ajutători („helper”) induc liza. Evoluția infecției cu fagi transductori este dependentă în mare măsură de gradul de modificare genetică a ADN fagic. Dacă fagul transductor este funcțional, evoluția urmează etapele caracteristice fagilor λ normali. Dacă fagul este defectiv, evoluția lizogenă este condiționată de prezența unui fag ajutător care furnizează regiunea de omologie genetică necesară pentru integrarea fagului transductor, integrându-se el însuși, cel dintîi, în genomul bacterian. Procesul evoluează într-un mod similar celui care asigură formarea bacteriilor dublu lizogene, prin inserția unei a doua molecule de ADN fagic în genomul unei bacterii lizogene (fig. 231).

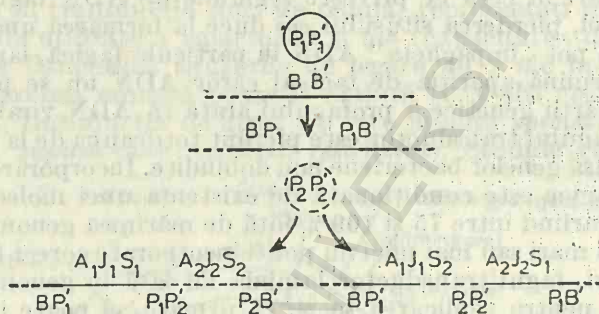


Fig. 231. — Mecanismele posibile ale inserției unui al doilea genom fagic într-un cromosom bacterian lizogen, pentru a forma o bacterie dublu lizogenă. Cercurile reprezintă ADN fagic; liniile groase — porțiuni din ADN cromosomal; PP' și BB' — situsurile de legare fagice, respectiv bacterian. Inserția celui de-al doilea profag se poate face pe două căi: 1) recombinarea catalizată de integrază are loc între P_2P_2' și un situs de legare recombinant BP_1' sau P_1B' (stînga) — rezultă doi profagi intacti, dispuși în tandem; 2) recombinarea catalizată de un sistem nespecific are loc într-un cistron fagic ca, de exemplu, J (dreapta) și primul profag este separat în două segmente prin integrarea celui de-al doilea — rezultă tot doi profagi în tandem, dar fiecare este recombinant (după Campbell, 1979).

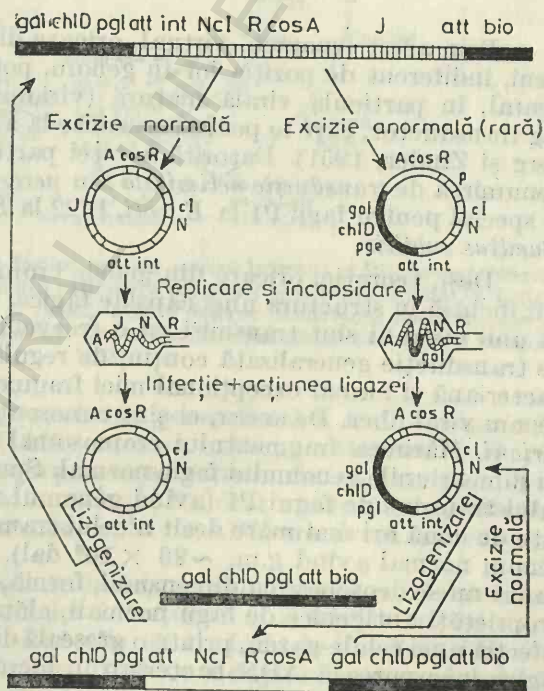
Soarta exogenotului după transducție. După ce genomul fagului transductor a pătruns în celula-receptoare evoluția sa ulterioară este diferită, în funcție de interacțiunile ce se stabilesc cu constituenții celulei-gază.

În unele cazuri, datorită caracterului său „străin”, exogenotul este recunoscut de sistemele enzimatică celulare și degradat, sub acțiunea unor enzime din categoria endonucleazelor de restricție, ca o consecință a fenomenului cunoscut sub denumirea de *restricție de către gazdă* („host restriction”).

În cazurile în care fenomenul de crossingover și integrarea ca profag sînt împiedicate, pe diferite căi, exogenotul are două posibilități de evoluție: 1) în cazul că poartă încă în structură sa determinanții genetici care condiționează replicarea, poate persista în celula unde se replică, dînd naștere unei clone de celule parțial diploide; 2) în cazurile în care este lipsit de determinanții genetici pentru replicare, poate persista fără să se replice, fiind transmis unilinear, numai la una din celulele rezultate din diviziunea celulei transduse, care devine parțial diploidă (*transducție abortivă*).

Cu o frecvență relativ mică, exogenotul se poate integra la nivelul unui locus specific în cromosomul endogenot, printr-un proces de recombinare genetică. Spre exemplu, infectarea unei celule bacteriene *gal⁻* cu fagul transductor $\lambda d gal^+$ îi conferă acesteia caracterul *gal⁺* și, odată cu acesta, capacitatea de a utiliza galactoza în metabolism. Celula bacteriană care a dobândit astfel un fenotip nou este numită *transductant*. În acest caz, transducția genetică specializată corespunde, de regulă, unui adăugări de material genetic: segmentul de material genetic exogen transdus este adăugat genomului gazdei și nu substituit. În exemplul dat, după infectarea celulei bacteriene, genomul fagului deși are două regiuni de omologie genetică în cromosomul bacterian, corespunzând situsului *att* și cistronului *gal⁻*, se leagă, prin intermediul regiunii sale *gal⁺* de regiunea de omologie genetică *gal⁻*, fără să o disloce, prin adăugări regiunii *gal⁺* în cromosomul bacteriei-receptoare printr-un proces de recombinare genetică. În felul acesta, în structura cromosomului bacterian apare un tandem de secvențe *gal⁻*, *gal⁺* și λd . Situsul obișnuit de legare a fagului (*att* λ) în cromoso-

Fig. 232. — Formarea unui genom λgal de la un profag λ (sus — porțiune din cromosomul unei bacterii lizogene pentru fagul λ). Fiecare linie orizontală reprezintă o catenă de ADN. Liniiile scurte verticale corespund legăturilor de H. Figura prezintă atât excizia normală, cât și cea anormală. Lizogenizarea după excizie normală refacă structura inițială. Lizogenizarea după excizie anormală (jos) produce o structură care poartă o duplicare a segmentului de genom bacterian imediat adiacent extremității stîngi a profagului (după Campbell, 1977).



mul bacteriei-receptoare, rămas liber, este, de regulă, ocupat de fagul λ helper normal, care a infectat bacteria în același timp cu fagul $\lambda d gal^+$. Astfel, bacteria transductantă poartă două copii ale unor gene bacteriene (*gal⁺* și *gal⁻*) și două copii ale genomului λ , dintre care una este de tip defectiv. Bacteria parțial diploidă (*merodiploidă*, *gal⁺* și *gal⁻*) este capabilă să utilizeze galactoza, deoarece gena *gal⁺* este dominantă, ceea ce în termeni moleculari înseamnă că produsul ei definește fenotipul (capacitatea

de a fermenta galactoză). Produsul genei anormale *gal⁻* este sintetizat în continuare în celulă, dar prezența sa este fără efect asupra fenotipului și, ca urmare, poate fi detectat numai dacă este izolat, prin analize biochimice.

După Birge (1981), această evoluție este caracteristică pentru ~2/3 din bacteriile transductante. Într-o treime din cazuri există posibilitatea ca determinanții genetici nou dobândiți (*gal⁺* sau *bio⁺*) să se substituie celor vechi (*gal⁻* și *bio⁻*), prin recombinare simplă, fără ca bacteria transductantă să devină lizogenă.

Transducția genetică specializată seamănă atât de mult cu sexducția (transferul de gene bacteriene mediat de o plasmidă de sex), încât cele două procese pot fi considerate ca două aspecte diferite ale aceluiași fenomen (fig. 232).

Transducția fagică generalizată

Prin acest fenomen, virtual, oricare din genele cromosomilor bacterieni, indiferent de poziția lor în genom, pot fi încorporate, în mod accidental, în particula virală matură (virionul fagic), pentru a forma un fag transductor, care le poate transmite la alte bacterii-receptoare (Lederberg și Zinder, 1951). Datorită acestei particularități, se cunoaște și sub denumirea de *transducție nelimitată* sau *nerestrictivă*. Procesul a fost descris în special pentru fagii P1 la *E. coli*, P 22 la *Salmonella*, SP 10 și PBS1 la *Bacillus subtilis*.

Deși, teoretic, oricare din genele cromosomale are o șansă egală de a fi inclusă în structura unei capside fagice, practica a demonstrat, totuși, că unii cistroni sînt transmiși cu o frecvență mai mare decît alții. Fagii de transducție generalizată conțin, de regulă, numai gene de proveniență bacteriană și numai excepțional mici fragmente adiționale, neintegrate de genom viral liber. De aceea, ei sînt cunoscuți și sub denumirea de *pseudovirioni*. Mărimea fragmentului cromosomal încorporat este proporțională cu dimensiunile genomului fagic normal. Spre exemplu, mărimea fragmentului transdus de fagul P1 (avînd genomul normal, g.m. ~60 × 10⁶ dal) este de două ori mai mare decît a celui transdus de fagul PLT 22 (cu un genom normal avînd g.m. ~26 × 10⁶ dal). Fagii de transducție generalizată nu se deosebesc ca dimensiuni, formă, caracteristici de adsorbție sau proprietăți antigenice de fagii normali, alături de care se formează, după infecția unei celule-gazdă, printr-o greșală de asamblare, cînd unele capside fagice încorporează ADN bacterian în loc de ADN fagic.

Procesul a fost cel mai bine studiat în cazul fagului P 22 de la *Salmonella typhimurium*. Fagul are un cap poliedric, legat printr-o coadă foarte scurtă de placă bazală, prevăzută cu 6 spicule. Genomul său (fig. 233) este alcătuit dintr-o moleculă de ADN lineară, permutată circular*, cu o redundanță terminală reprezentînd ~2,5% din mărimea genomului respectiv. Infecția bacteriilor este urmată de circularizarea ADN, printr-un

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 40.

proces de recombinare la nivelul redundanțelor terminale, condiționat de prezența produsului genei *erf* („essential recombination function”). Ciclul litic este condiționat de replicarea ADN, după modelul „cercului rotativ”, cu producerea de ADN concatenar și traducerea informației genetice virale.

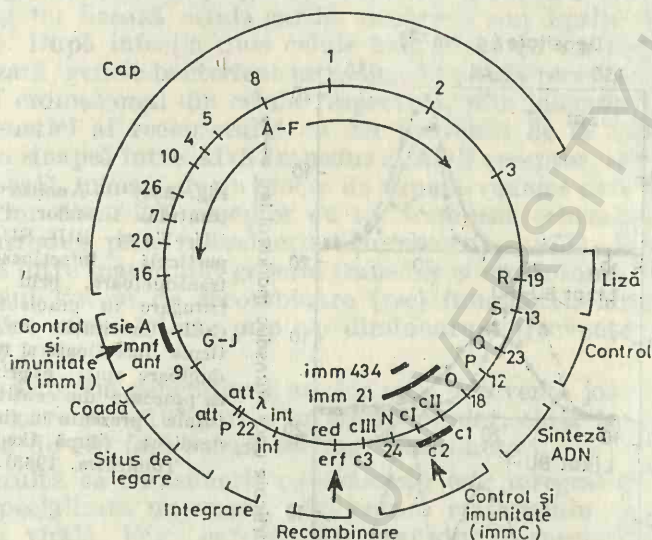


Fig. 233. — Comparatie între hărțile fagilor lambda (cercul interior) și P22 (cercul exterior). Barele groase din interiorul hărții λ indică extinderea regiunilor substituite în unele variante λ , iar cele din exterior regiunile *imm1* și *immC*. Liniile externe delimitează markerii celor doi fagi care prezintă o importantă similaritate de funcție genetică (după Susskind și Bottjtein, 1978).

Natura ADN din fagii de transducție generalizată a fost demonstrată de către Ikeda și Tomizawa (1965), care au cultivat o tulpină de *E. coli* auxotrofă pentru timină (T), fie în prezența acesteia, fie în prezența 5-bromuracilului (5-BU), și au infectat-o cu fagul P1 de transducție generalizată. Incorporarea 5-BU în structura moleculei de ADN are drept urmare creșterea densității acesteia.

Au fost studiate trei tipuri de lizate, urmărindu-se titrul și densitatea în gradient de CsCl_2 a particulelor infectioase și a fagilor transductori, care poartă markerul genetic *leu*⁺ (fig. 234). Lizatele T—T și BU—BU provin din culturi efectuate integral (înainte și după infecția cu fagul P1), în prezența aceluiași precursor al sintezei de ADN (timină sau 5-BU). Lizatul BU—T provine dintr-o cultură bacteriană expusă la 5-BU, înainte de infecția cu fagul P1 și la timină după această infecție. Din figură rezultă că în cazul lizatelor T—T și BU—BU, atât titrul cât și densitatea particulelor fagice infectioase și transductoare înregistrează valori apropiate. În schimb, în cazul lizatului BU—T, densitatea particulelor infectioase este determinată de precursorul T, prezent după infecția fagică în timp ce densitatea fagilor transductori depinde de natura precursorului prezent în mediu înainte de infecție. Aceste date permit concluzia că ADN din fagii

transductori provine, cel puțin în cea mai mare parte din ADN bacterian, sintetizat în prezența 5-BU, înainte de infecția cu fagul P1.

Schmieger (1970), studiind particularitățile fagului transductor P22 consideră că ~90% din genomul acestuia ar fi format din ADN bacterian și numai ~10% din ADN fagic, legat covalent.

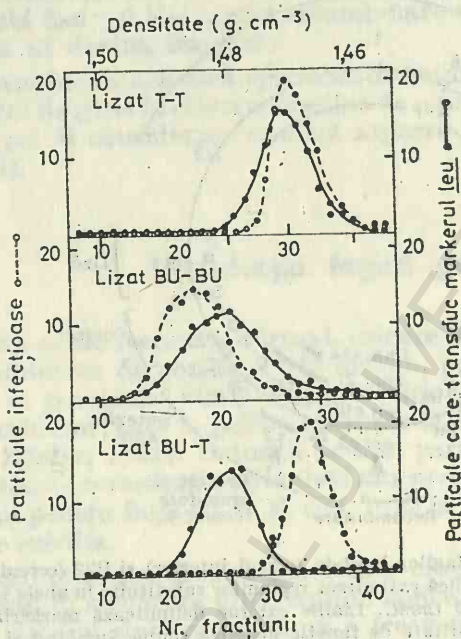


Fig. 234. — Analiza conținutului lizatelor T-T, BU-T și BU-BU în particule infectioase și transductoare, prin centrifugare în gradient de CsCl. Cantitățile de particule infectioase și transductoare sînt exprimate ca procente din cantitățile totale prezente în fiecare gradient (după Ikeda și Tomizawa, 1965).

„Împachetarea” ADN fagic se face după mecanismul descris la fagul T4*. În cazul fagului P22 lungimea moleculei de ADN încapsidate depășește cu 2,5% lungimea genomului („headful genome”), datorită unui mecanism specific care poate recunoaște și tăia ADN fagic concatenat la unități monomere, la nivelul unor situsuri multiple. Același mecanism poate recunoaște și un număr de situsuri din structura cromosomului bacterian, pe care îl secționează în segmente asemănătoare ca mărime genomului fagic. Ca urmare, spre sfîrșitul ciclului litic, cînd cromosomul bacterian este degradat în fragmente, în timp ce majoritatea genomurilor fagice sînt „împachetate” în capetele fagice goale, unele fragmente din genomul bacterian pot fi incluse, la întîmplare, din eroare, într-o capsidă fagică. În general, în cursul acestui proces este „împachetat” mai frecvent ADN fagic decît bacterian. Aceasta sugerează, fie că ADN fagic are un număr mai mare de situsuri de clivare, fie că eficiența acestui proces este mai mare cu ADN fagic.

Mecanismul de „împachetare” a ADN bacterian transductor în locul celui fagic a fost numit de Ozeki „alegerea învelișului” („wrapping choice”).

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 225.

Cind celulele bacteriene se lizează, ele eliberează două tipuri de fagi și anume cea mai mare parte cu structură normală (conținând numai ADN fagic) și un număr foarte mic de fagi transductori, care conțin fie numai ADN bacterian, provenit practic din orice regiune a cromosomului, fie, mai rar, o cantitate mică de ADN fagic, căruia i se adaugă gene bacteriene.

Fagii de transducție generalizată sînt totdeauna defectivi: ei nu se replică și nu lizează celula-gazdă, deoarece sînt lipsiți de genele virale esențiale. După infecția unei celule bacteriene cu un fag de transducție generalizată, genele bacteriene introduse în celula-receptoare se recombină cu ADN cromosomal din celula respectivă, prin înlocuirea unor determinanți genetici ai receptorului cu cei proveniți de la donator. Procesul implică o sinapsă între ADN transdus și ADN receptor, însoțită de o denaturare locală, urmată de un proces de rupere-reunire care duce la înlocuirea genelor din ADN receptor cu un fragment echivalent provenit din ADN introdus prin transducție (Herskowitz, 1977). Procesul necesită omologie între materialul genetic transdus și cromosomul receptor și prezența unui sistem de recombinare (*rec*) funcțional. Mutantele *rec*⁻ ale *E. coli* sînt caracterizate printr-o diminuare a frecvenței de transducție cu fagul P1.

Transducția generalizată are loc cu o frecvență joasă (~ o particulă transductoare la ~10⁵ particule normale), dar, chiar în acest caz, într-o populație de 10⁹ fagi există 10⁴ fagi transductori.

Rezultă că transducția generalizată este integral diferită de transducția specializată nu numai prin natura materialului genetic purtat de particula virală. Fagii care produc transducție specializată sînt obligatorii lizogenizanți și transferul de material genetic este condiționat de inducția litică a celulei lizogene. Fagii de transducție generalizată nu sînt obligatoriu lizogenizanți, iar transferul de gene se face fie prin inducție, fie prin infecția unei celule nelizogene cu un fag temperat, urmată de replicarea lui și de liză celulară.

Transducția abortivă

Transducția abortivă corespunde situației în care ADN transductor pătruns în bacteria-receptoare nu reușește să se integreze în mod stabil în cromosomul acesteia (*transducție incompletă*). El este, totuși, funcțional și își exprimă genele pe care le poartă (este transcris la ARN^m și tradus), celula-receptoare fiind diploidă pentru segmentul corespunzător al cromosomului. Deoarece nu este replicat, în momentul cînd celulele transduse se divid, el este transmis numai la una din celulele-fiice (*transmitere uniliniară*) și, ca urmare, este progresiv diluat (fig. 235) în cursul dezvoltării culturii respective (Stocker, Zinder și Lederberg, 1953). Transducția abortivă apare în special după transducția generalizată, cînd fragmentul de cromosom bacterian transdus, care nu se poate recombină și nici replica, rămîne funcțional în celula-receptoare.

Fenomenul a fost bine studiat în cazul mobilității la *Salmonella*. Bacteriile imobile (fără flageli, *fla*⁻) devin mobile (*fla*⁺) după transducție

abortivă, dar la fiecare diviziune, celulele mobile lasă pe loc o celulă-soră imobilă (*fla*⁻), care formează ulterior o colonie. Transducția abortivă a fost descrisă și pentru markerii de fermentație (Gross și Englesberg, 1959), ca și pentru anumite caracteristici de nutriție. Astfel, dacă o celulă auxo-

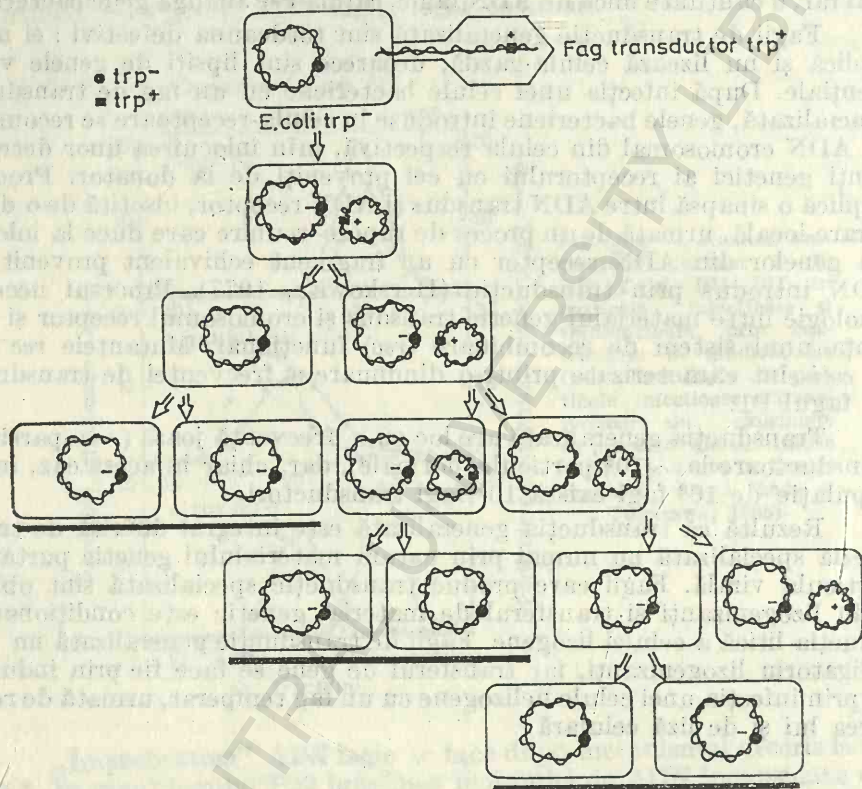


Fig. 235. — Transducția abortivă. Reprezentarea schematică a modului de transfer unilinear al determinantilor genetici *trp*⁺, proveniți din cromosomul bacterian, în cursul diviziunilor celulare la descendenți.

trofă primește prin transducție abortivă un segment de ADN, care conține informația necesară ca să devină prototrofă, ea sintetizează enzimele respective și se dezvoltă pe mediile minimale, crește și se divide, dar numai una din celule primește segmentul cromosomal transdus și, ca urmare, numai una din celule crește și se divide normal. Cealaltă celulă se poate dezvolta numai atît timp cît ARNm și enzimele rămase în structura sa de la celula parentală mai sînt funcționale. Datorită acestui mecanism, bacteriile prototrofe formate prin transducția abortivă a unor celule auxotrofe formează, pe medii solide minimale, colonii foarte mici și neregulate ca formă. Aceste colonii rezultă deci, în special, din creșterea lineară (nu exponențială ca în mod normal) a bacteriei, în care segmentul transdus asigură complementarea genelor, deoarece, la fiecare diviziune, numai una din celulele rezultate are caracterul nutrițional de tip prototrof.

Frecvența transducției se apreciază în funcție de numărul fagilor transductori raportat la numărul unităților de fagi care formează plaje de liză (PFU „plaque forming units”). Spre exemplu, dacă un amestec de transducție care conține 1×10^9 celule bacteriene și 2×10^9 PFU produce 2×10^3 fagi transductori, frecvența transducției este de $2 \times 10^3 / 2 \times 10^9$ sau 1×10^{-6} . De regulă, frecvența transducției este joasă ($1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$), ceea ce înseamnă că numai una din $10^4 - 10^8$ particule fagice se comportă ca fag transductor, adică transportă gene bacteriene în genomul său. Pe de altă parte, prezența caracterelor marcante, transmise prin transducție este rareori evidențiată, deoarece numai una din 10^5 bacterii-receptoare prezintă acest caracter nou, ca urmare a integrării prin recombinare a exogenotului. Ea este influențată de natura fagului, de metodele utilizate pentru propagarea lui și de starea fiziologică a bacteriilor.

Deși frecvența transducției este atît de rară, ținînd seama de incidența ridicată a fagului temperat și de abundența populațiilor bacteriene în natură este, probabil, că transducția reprezintă modul de transfer genetic în urma căruia recombinarea se produce cu cea mai mare frecvență.

Transducția fagică furnizează o cale de înaltă putere de rezoluție pentru analiza fenomenului de recombinare genetică în regiuni mici ale genomului bacterian. Această proprietate este exploatată într-o mare măsură în studiile de genetică moleculară pentru stabilirea structurii fine a genomului bacterian.

Transferul de gene asociat cu fagii („phage associated gene transfer”)

Sub această denumire, Porter (1976) a descris un mecanism particular de transfer de material genetic întâlnit în sistemul *Streptococcus pneumoniae*/fagul PG 24. Particulele capabile să transmită gene în prezența DNazei sint întâlnite în lizatele de cultură de pneumococ produse de fagul PG 24. Procesul este asemănător transducției generalizate, deoarece implică participarea unui fag temperat și poate transfera toți markerii testați pînă în prezent. Există, totuși, unele diferențe față de transducția generalizată tipică, deoarece procesul este dependent de prezența în celula-receptoare a aceleiași endonucleaze legată de membrane, care asigură înglobarea ADN în transformarea genetică la pneumococ (Guild și colab., 1974; Tiraby și colab., 1975). Particulele care asigură transferul sint sensibile la serul antifag PG 24 și la acțiunea tripsinei, dar în măsură mai mică decît fagul infecțios. Ele ar putea fi reprezentate, după cum probează unele date de microscopie electronică, de capete de fagi, fără coadă, pline cu ADN cromosomal bacterian (Brooks-Low și Porter, 1980).

Capsducția

Capsducția reprezintă un mecanism de transfer de material genetic realizat prin intermediul unor structuri similare capsidelor virale, prezente în filtratele de cultură acelulare ale bacteriei fototrofe *Rhodospseudomonas capsulata* (Marrs, 1974).

Capsida-vectoare, descrisă sub denumirea de *agent de transfer al genelor*, seamănă cu fagii foarte mici. Prezintă un cap cu simetrie icozadrică, cu \varnothing de 30 nm, prevăzut cu scurte spicule („spikes”) și o coadă scurtă, necontractilă, cu lungime variabilă, și \varnothing de 5,0–6,0 nm. Conține o moleculă de ADN dublu helical linear, cu g.m. de $\sim 3,6 \times 10^6$ dal corespunzând la $\sim 4,0$ – $4,5$ kb, din care $\sim 95\%$ a fost identificat ca provenind din genomul bacteriei-gazdă (Marrs, 1976).

Nu se cunoaște modul în care se realizează pătrunderea în celula-gazdă și nici modul de formare și de eliberare. De asemenea, nu s-a reușit transmiterea agentului de transfer al genelor prin infecție la alte bacterii, care nu îl pot produce spontan. Este, probabil, că el este un „prefag” și nu un sistem viral defectiv și că a apărut prin evoluția regresivă a unui fag, anterior normal. Prin capsducție se pot transmite mai multe gene cromosomale în absența unor interacțiuni de tipul contactului intercelular (ca în conjugare), chiar în prezența DNazei.

Considerată inițial ca un caz particular de transducție generalizată, capsducția se deosebește de sistemele de transducție fagică la bacterii prin mai multe proprietăți : a) agentul de transfer în capsducție este mai mic decât orice fag transductor și chiar mai mic decât oricare alt fag cu complexitate morfologică similară, descris până în prezent ; b) transferul de material genetic nu este asociat cu nici o activitate de tip fagic ; c) majoritatea tulpinilor de *R. capsulata*, izolate din natură, conțin capside de tipul agentului de transfer al genelor, fără a prezenta fenomene de liză ; „infecția” unor tulpini normale cu „agentul de transfer al genelor” nu induce capacitatea de a fi format de către celulele-receptoare care nu îl produc spontan.

Originea evolutivă a capacității de capsducție este pur speculativă.

Conversia fagică

Deși a fost studiat mai mult în ultimul deceniu, cadrul conceptului de conversie fagică este încă insuficient definit. După Brooks-Low și Porter (1978), conversia fagică corespunde modificărilor fenotipice apărute într-o cultură bacteriană, în urma prezenței unui fag temperat în populația respectivă. Acest rezultat poate fi consecința prezenței unui profag integrat stabil în genomul bacteriei-gazdă sau manifestarea la un nivel scăzut a unor virioni activi, în cultură. În cazurile în care se poate stabili neîndoielnic că modificarea fenotipică este consecința directă sau indirectă a prezenței unui profag stabil, fenomenul poate fi denumit *conversie lizogenă*. De regulă însă, deoarece se lucrează cu populații bacteriene și nu cu celule izolate, distincția între cele două modalități posibile de producere este greu de făcut.

Noțiunea de modificări fenotipice este, de asemenea, vagă și interpretată diferit. Astfel, Schwartz (1976) limitează cadrul modificărilor fenotipice la capacitatea bacteriilor de a face sinteza și de a secreta (nu excreta) anumite substanțe și la modificările antigenice ale suprafeței celulare. Girard și Hirth (1980) conferă acestei noțiuni un cadru larg, incluzând și unele fenomene particulare ca imunitatea față de fagii omologi exogeni conferită de profagul λ la *E. coli*, sistemul de restricție—modificare indus de profagul P1, fenomenele de excludere de suprafață și evoluția nepermisivă indusă de unii profagi etc.

Poziția acestei modalități de transfer de gene în ansamblul mecanismelor de transfer genetic la bacterii este de asemenea interpretată în mod contradictoriu. Mulți cercetători consideră conversia fagică drept o variantă de transducție specializată. În realitate, între cele două procese există unele deosebiri fundamentale. În primul rând, modificările fenotipice induse de un fag de transducție specializată sînt rezultatul introducerii de *gene bacteriene*, în timp ce conversia fagică este consecința introducerii de *gene fagice* (deși este posibil ca la origine aceste gene „fagice” să fi făcut parte integrantă din cromosomul bacterian). În al doilea rând, particulele fagice care determină conversia sînt complet normale și posedă toate funcțiile fagice. În contrast cu ele, fagii de transducție specializată sînt defectivi, deoarece au pierdut anumite gene fagice, care au fost înlocuite cu gene cromosomale. Într-o încercare de a stabili cadrul conceptual al celor două procese, Brooks-Low și Porter (1978) propun limitarea noțiunii de transducție specializată la situațiile în care fagul, în forma în

care este găsit normal în natură, nu poartă gene și funcții bacteriene și le obține numai ca rezultat al unui proces de recombinare genetică, ce evoluează, cu o frecvență mică. În opoziție cu acesta, conversia fagică reprezintă procesul determinat de un fag, care în forma prezentă normal în natură poartă gene bacteriene, sau situația în care există posibilitatea ca o funcție proprie fagului să se substituie unei funcții bacteriene.

Exemple de conversie fagică. Descoperirea fenomenului de conversie fagică este legată de observația că toate tulpinile de *Corynebacterium diphtheriae* patogene sînt lizogene, datorită prezenței profagului β integrat în structura cromosomului lor. Gill și Pappenheimer (1971) au demonstrat că gena structurală care codifică sinteza toxinei difterice este situată în genomul fagului temperat β . Utilizînd genomul fagic ca matriță, sinteza toxinei difterice a fost obținută și *in vitro*, într-un sistem acelular de transcriere—traducere genetică. Tulpinile nelizogene nu sînt toxigene și, ca atare, nu sînt patogene. Toxina nu influențează multiplicarea fagului, deoarece mutantele netoxigene se multiplică în același ritm ca și celulele lizogene.

Un alt exemplu mai mult studiat este legat de structura lipopolizaharidelor din peretele celular la *Salmonella*. După cum este știut, lipopolizaharidele constituie, prin fracțiunea lor glucidică, un sistem de antigene (antigenele „O”) care caracterizează anumite tulpini de *Salmonella* și au permis gruparea lor în serotipuri, cu semnificație deosebită pentru diagnosticul de laborator și pentru epidemiologie. Studiul determinismului lor genetic a arătat că formarea anumitor compuși este codificată de gene cromosomale, iar a altora de gene fagice. Astfel, *Salmonella anatum* avînd serotipul O : 3, 10, poate fi convertită după lizogenizare cu fagul ϵ 15 la serotipul 3,15 (*conversie serologică*). Acest serotip se deosebește de cel normal prin înlocuirea legăturilor α dintre galactoză și manoză, prin legături β și prin neacetilarea resturilor de galactoză din structura peretelui celular. Aceste modificări fenotipice rezultă din faptul că sub influența informației genetice purtată de profag are loc sinteza a două proteine-represor, care blochează sinteza enzimelor bacteriene, ce asigură formarea de legături α și procesele de acetilare, înlocuindu-le cu o enzimă de origine virală, capabilă să formeze legături β -galactozil. Bacteriile lizogenizate de profagul ϵ 15 revin la serotipul original (3,10) dacă pierd profagul. Conversii similare pot asigura și fagii ϵ 14, ϵ 27 ș.a.

Conversia fagică a mai fost descrisă la *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* etc.

Semnificație biologică. Fenomenul de conversie fagică reprezintă traducerea fenotipică a unei părți din genele unui profag prezent în mod persistent în celula bacteriană. Dovada o constituie faptul că îndepărtarea profagului determină revenirea bacteriilor la tipul anterior, normal. Capacitatea genelor bacteriene de a înlocui unele gene fagice și invers este expresia unei strînse relații filogenetice între anumiți fagi și bacteriile-gazdă și a posibilității evoluției lor de la un strămoș comun. Datorită acestor înrudiri este posibil ca o genă care codifică o anumită proprietate să poată fi găsită numai în cromosomul bacterian (situația „normală”), numai în genomul fagic (conversie fagică) sau în ambele (transducție).

Transfecția

Transfecția este o varietate neobișnuită de transformare genetică, în care sursa de ADN nu este o bacterie, ci un bacteriofag. În anumite condiții, care includ în special lipsa RNazei din mediu, transfecția poate fi efectuată și cu ARN fagic. A fost definită de Foldes și Trautner (1964) ca infecția celulelor bacteriene cu acid nucleic viral izolat, avînd ca urmare producerea de virus matur *.

Rezultatul transfecției, evident după dispersarea suspensiei bacteriene pe suprafața mediului de cultură în plăci, este reprezentat de apariția de plaje de liză, al căror număr este proporțional cu cantitatea de ADN adăugat. Transfecția a fost realizată pînă în prezent la *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Shigella paradysenteriae*, *Salmonella typhimurium* și *B. subtilis*.

Transfecția la *E. coli*

Forma cea mai cunoscută a transfecției a fost descrisă de Kaiser și Hogness (1960) la *E. coli*. Infecția este rezultatul interacțiunii dintre ADN purificat de fag transductor (spre exemplu, λ dg λ), cu o celulă receptoare λ -lizogenă sau infectată simultan cu un fag ajutător netransductor, care furnizează sistemului anumite funcții nespecifice sau asigură perforarea peretelui celular. Datorită acestui mecanism, transfecția de acest tip a fost numită *transfecție „ajutată”* („helped transfection”).

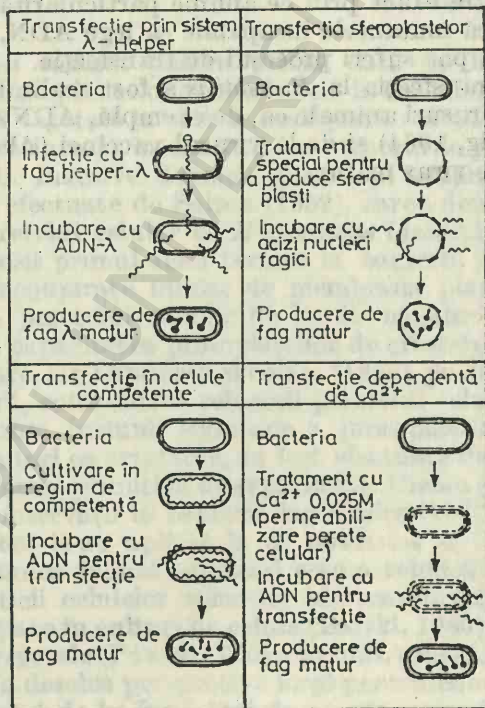
În unele cazuri, transfecția se poate realiza și cu fragmente de ADN, dacă acestea au situsuri *cos* identice sau aproape identice cu cele ale genomului helper. Este probabil că pe măsură ce fagul helper injectează propriul său ADN în celula bacteriană, situsul *cos* al fagului de transfecție se leagă de ADN helper, pe care îl împinge în celulă. Raportul optim dintre fagii helper și celulele receptoare este de 5—15 per bacterie. În funcție de condițiile de mediu, frecvența transfecției variază între 10^{-7} și 10^{-3} .

Întrucît fagii transductori conțin gene cromosomale, transfecția realizează în același timp și o transformare genetică, în sens propriu (Takagi și Ikeda, 1982). Transfecția apare totuși ca o modalitate simplificată de transformare genetică bacteriană, deoarece în transfecție, realizată de regulă prin intermediul unei molecule genomice virale întregi, recombinația genetică și celelalte fenomene care apar în cursul creșterii

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 229.

unei clone transformate genetic nu sînt necesare (Spizzizen, Reilly și Evans, 1966). Recombinarea genetică consecutivă transfecției este necesară numai dacă este realizată cu fragmente de genomuri virale. Ca și în transformare, în transfecție, adăugarea simultană de ADN viral și ADN aparținînd bacteriei-gază reduce substanțial eficiența procesului, probabil ca rezultat al competiției în înglobarea de ADN. Cinetica transformării genetice și a transfecției este foarte asemănătoare. Diferențele existente reflectă faptul că ADN viral are o masă moleculară mare, în raport cu fragmentele de ADN transformant. De asemenea, ca și în transformarea genetică, transfecția prezintă o dependență lineară față de concentrația de ADN adăugat și fenomenul de saturare la concentrații mari de ADN (fig. 236).

Fig. 236. — Reprezentarea schematică a diferitelor tipuri de transfecție (modificat după Trautner, 1973).



Transfecția la *E. coli* se mai poate realiza și pe alte căi, de exemplu prin infectarea sferoplastilor sau în prezența ionilor de calciu (transfecție „neajutată”). „Șocul de calciu” folosit în experimentele de inginerie a genelor, asigură o mărire a permeabilității învelișurilor celulare față de ADN de diferite proveniențe. Efectul pretratării cu Ca^{2+} 0,025 M a fost demonstrat inițial la *E. coli* cu ADN provenit din fagii λ și P2. Sferoplastii de *E. coli* se obțin prin îndepărtarea parțială a peretelui celular cu lizozim, penicilină sau EDTA-lizozim). EDTA acționează îndepărtînd Mg^{2+} din peretele celular, cu lezarea membranei externe, ceea ce creează o cale de acces pentru lizozim spre stratul peptidoglicanic. Deși procesul se realizează cu o eficiență mai mică decît transfecția „ajutată” și pare să fie

dependent de consumul de energie, a fost realizat cu o serie de molecule de ADN și ARN, provenite de la fagii T1, T3, T-par, Φ X174, MS2, M13, Q β , P1, P2, P22 Mu (Birge, 1981).

Transfecția la *B. subtilis*

Celulele de *B. subtilis* prezintă o stare naturală de „competență” și, ca urmare, servesc ca receptori de ADN fără vreun tratament special pregătitor. Procesul se realizează cu o eficiență foarte scăzută. După Young și Spizzigen (1963), numai 1—4% din cantitatea de ADN din mediu este înglobat ireversibil, chiar în cazurile în care concentrația în mediu este suficientă pentru a transforma toate celulele prezente.

Transfecția la *B. subtilis* este diferită de transformarea genetică, deși nu se știe exact prin ce anume particularități. Dovada o constituie însă faptul că mutantele incapabile să lege ADN, care nu pot fi transformate genetic, pot suferi procesul de transfecție.

Transfecția la *B. subtilis* a fost realizată și cu ADN provenit de la unele virusuri animale ca, de exemplu, ADN de *Poliomavirus* (Bayreuther și Romig, 1964) și de la virusul vacciniei (Abel și Trautner, 1964), cu formare de virus matur.

Fuziunea protoplaștilor bacterieni

„Protoplaștii nu mai sînt simple curiozități citologice. Capacitatea lor de a fuziona i-a făcut unul din instrumentele importante ale biologiei moderne“

L. FERENCZY

Termenul de protoplast utilizat pentru prima dată de Hanstein (1880) își are originea în citologia plantelor și este folosit în botanică pentru a descrie constituenții celulei vegetale în care se desfășoară reacțiile metabolismului energetic și de biosinteză, în contrast cu structurile parietale extracitoplasmatiche metabolice inactivate. Primele observații asupra protoplaștilor bacterieni au fost efectuate de Salton (1952), care a demonstrat posibilitatea îndepărtării peretelui celular la *Micrococcus lysodeikticus* cu lizozim. Weibull (1953) a folosit primul acest termen la bacterii, pentru a desemna entitățile sferice înconjurate numai de membrana plasmatică, obținute după îndepărtarea peretelui celular de la *B. megaterium*. Mc Quillen (1955) a demonstrat capacitatea protoplaștilor de creștere și diviziune în medii corespunzătoare, iar Landman și colab. (1968), posibilitatea reversiei lor la forma bacilară, consecutivă refacerii peretelui celular.

Primele observații asupra fuziunii spontane a protoplaștilor bacterieni, considerate de unii autori ca artefacte, au fost efectuate de Mellon (1925), care le-a descris ca o formă primitivă de sexualitate. Dienes și Smith (1944) au confirmat aceste observații la bacterii, iar Muller (1966, 1970), ca și Lopez—Belmonte (1966) le-au aplicat la *S. cerevisiae* și *Candida*, respectiv la *Fusarium*. Fuziunea indusă artificial este o tehnică folosită curent pentru studiul geneticii celulelor somatice ale mamiferelor și al exprimării funcțiilor diferențiate în culturi de celule (Barski, 1960). Fuziunea protoplaștilor celulelor vegetale (Power, 1970) a permis, uneori, regenerarea unor plante hibride și a deschis perspective largi pentru combinarea proprietăților dorite, provenind de la două linii de plante, sexual incompatibile (Villanueva, 1973). Produsul primar al acestor fuziuni este o celulă, animală sau vegetală, care conține o protoplasmă amestecată și doi sau mai mulți nuclei, reprezentînd genomurile complete ale celor două celule parentale.

Transferul de informație genetică la bacterii prin fuziune de protoplaști a fost demonstrat la *B. subtilis* de Schaeffer și colab. (1976) și la *B. megaterium* de Fodor și Alföldi (1976). Au fost utilizate, în acest scop, tulpini mutante, dublu sau triplu auxotrofe, care se complementau reciproc nutrițional (de exemplu, tulpina A, *arg*⁻, *leu*⁻, *his*⁺, *try*⁺ și tulpina B, *arg*⁺, *leu*⁺, *his*⁻, *try*⁻). Produșii fuziunii au determinat colonii formate din bacterii revenite la forma bacilară și la condiția de nutriție prototrofă.

Acest fenomen nu s-a produs niciodată cînd bacteriile poliauxotrofe au fost înșămîntate separat și nici după contactul celor două populații bacteriene netransformate în protoplaști, ceea ce demonstrează că bacteriile prototrofe provin din fuziunea protoplaștilor. Procesul nu este influențat de prezența DNazei în mediu, ceea ce exclude posibilitatea unei transformări genetice. Frecvența formării de bacterii prototrofe poate depăși 1×10^{-4} din populația totală de protoplaști prezenți inițial. Ulterior, diferitele etape ale tehnicilor de fuziune a protoplaștilor s-au perfecționat, fapt care a determinat apariția unei noi tehnici foarte utile, de inducere a transferului de gene în special la bacteriile Gram-pozitive.

Producerea protoplaștilor se realizează prin îndepărtarea peretelui celular cu ajutorul lizozimului la *B. subtilis* și *B. megaterium* sau cu lizostafin la *Staphylococcus*. La bacteriile Gram-negative, prezența membranei externe face dificilă obținerea de protoplaști adevărați, reprezentînd o barieră importantă față de interacțiunile genetice. Tratarea cu lizozim determină formarea de sferoplaști prin îndepărtarea parțială a peretelui celular. Weiss (1976) recomandă pentru îndepărtarea membranei externe a *E. coli* utilizarea asociată a lizozimului cu EDTA*, care ar acționa prin disocierea componentei lipidice din structura peretelui celular. Formarea protoplaștilor, sub acțiunea enzimelor litice sau a inhibitorilor sintezei peretelui celular bacterian, se efectuează în prezența stabilizatorilor osmotici. Pentru a urmări realizarea de recombinanți se folosesc markeri genetici de morfologie și/sau culoare, auxotrofie, rezistență la anumite antibiotice, termosensibilitate, deficiență respiratorie etc. Complementarea care rezultă este o indicație a fuziunii eficiente. Kao și Michalyuk (1974) au demonstrat că polietilenglicolul (PEG), cu g.m. 4 000—6 000 dal, în soluție concentrată (50% greut/vol), în prezența ionilor de Ca^{2+} (CaCl_2 10—100 mM), stimulează fuziunea protoplaștilor. PEG determină agregarea protoplaștilor în grupuri foarte mari, vizibile cu ochiul liber. După îndepărtarea PEG, protoplaștii nelizați se separă și se dispersează în mediu (fig. 237).

Etapela fuziunii protoplaștilor au fost urmărite la microscopul electronic (Ferenczy și colab., 1976). Inițial, are loc aglutinarea protoplaștilor produsă de deshidratarea intensă și formarea de agregate de diferite dimensiuni, după care ei se contractă și apar foarte deformați. La situsurile de contact strîns are loc o translocatie de proteine membranare, urmată de interacțiuni lipidice între membranele adiacente. Perturbarea inițială, urmată de reorganizarea moleculelor lipidice, intens stimulată de Ca^{2+} , duce la fuziuni în mici regiuni de contact intermembranar. Se formează mici punți citoplasmatiche, care apoi se mărește și cei doi protoplaști fuzionează.

Regenerarea implică refacerea peretelui celular și revenirea la structura celulară inițială a clonelor transformate pentru a putea fi utilizate. Ea este o expresie a unei proprietăți generale și esențiale a tuturor organismelor vii, de a-și repara leziunile provocate structurilor și funcției lor.

* EDTA, sarea de sodiu a acidului etilen diaminotetraacetic, $(\text{HOOCCH}_2)_2 \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$

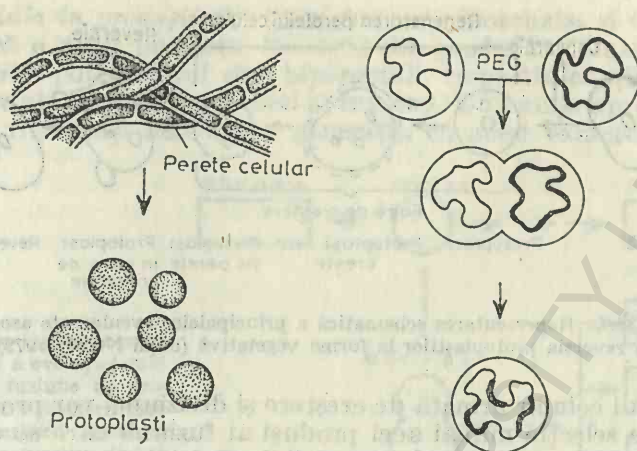


Fig. 237. — Reprezentarea schematică a unei experiențe de fuziune de protoplasti de *Streptomyces*. Fuzionarea facilitată de polietilenglicol (PEG) duce la formarea unei celule hibride care conține cromosomii celor două specii de bacterii utilizate, care se recombină pentru a produce un genotip nou.

Ca urmare, toate celulele cu perete — indiferent de trecutul lor evolutiv — sînt potențial capabile să-l regenereze, dacă a fost îndepărtat artificial. Cu toate acestea, regenerarea reprezintă faza cea mai dificilă în fiecare sistem, deoarece, pe lângă unele exigențe de ordin general, necesită condiții speciale nutriționale, de mediu (presiune osmotică, substanțe stabilizatoare) etc.

Procesul decurge în trei etape : 1) regenerarea peretelui celular lipsă ; 2) reversia, respectiv formarea unei noi generații de celule (*revertanți*), din protoplastii care și-au format prin biosinteză *de novo* peretele celular (fig. 238) ; 3) faza de creștere datorită sintezei de macromolecule și la eucariote de reproducere a tuturor organelor celulare.

Frecvența regenerării, variind inițial între 1 și 10 %, poate ajunge la *B. subtilis*, cu ajutorul agenților stabilizanți (serumalbumină, gelatină etc.), la 100 % (Hopwood, 1981). Protoplastii care nu își regenerează peretele celular, cu excepția formelor L ale bacteriilor, mor după o perioadă mai mult sau mai puțin lungă. Levi și colab. (1977) au demonstrat că pentru fuziune nu este indispensabilă viabilitatea ambilor parteneri. Protoplastii de *B. subtilis* omorîți cu streptomycină pot fi utilizați ca parteneri în fuziune cu protoplastii vii ai unei tulpini streptomycinorezistente pentru a obține recombinanți. Fuziunea protoplastilor determină formarea unei noi entități, care provenind din unirea conținutului protoplastilor va forma o bacterie bi- sau multinucleată, care fie în cursul reversiei la forma bacilară, fie ulterior, într-o perioadă scurtă de timp, segregă și produce colonii compuse din bacterii cu genotip haploid, modificat prin recombinare (fig. 239).

Mecanismul molecular al interacțiunii genom — genom este necunoscut. Deoarece reversia protoplastilor la forma bacilară implică regene-

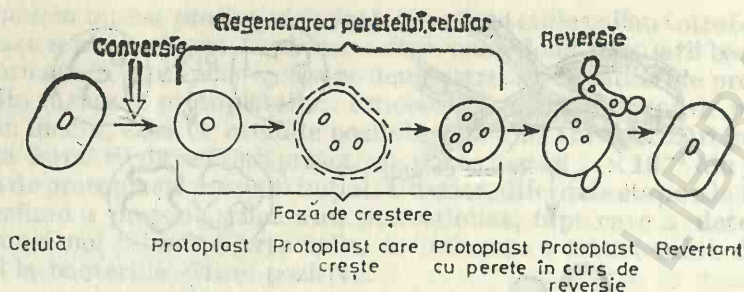


Fig. 238. — Reprezentarea schematică a principalelor evenimente asociate cu reversia protoplaștilor la forma vegetativă (după Nečas, 1979).

rarea peretelui celular urmată de creștere și diviziune, vor produce colonii pe mediul de selecție numai acei produși ai fuziunii care se complementează, adică acei la care etapele timpurii de diviziune au produs genotipuri recombinante stabile sau cei capabili să păstreze starea diploidă, de complementare, pentru mai multe generații. Izolarea frecventă de colonii primare alcătuite din clone bacteriene cu genotipuri stabile, demonstrează că în mod obișnuit atât segregarea, cât și recombinarea merg în paralel cu procesul de reversie la forma bacilară și cu formarea coloniilor (Schaeffer, 1976).

Genetica fuziunii protoplaștilor bacterieni. Spre deosebire de mecanismele naturale de transfer de material genetic, care au un caracter unidirecțional (de la donator la receptor), în sistemele de fuziune a protoplaștilor nu există polaritate. Cei doi parteneri sînt egali atât în capacitatea lor de a dona, cât și în capacitatea de a primi informație genetică și deci de a forma recombinanți genetici adevărați. Procesul de fuziune a protoplaștilor nu este limitat de nici o barieră genetică sau de incompatibilitate: practic orice protoplast poate fi fuzionat cu oricare alt protoplast (Hopwood, 1981; Hotchkiss, 1983).

Detectarea recombinanților genetici după fuziune se poate realiza pe mai multe căi.

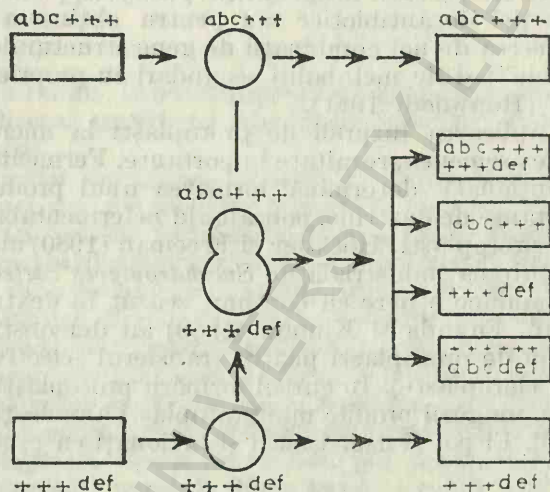
Tehnicile de selecție directă se bazează pe însămînțarea prin dispersie a amestecului de protoplaști pe un mediu special de reversie, suplimentat cu acele substanțe care permit numai dezvoltarea celulelor recombinante și în acest fel selecția lor.

Tehnicile de selecție indirectă recurg la dispersia amestecului de protoplaști pe un mediu de dispersie bogat în nutrienți, în care are loc reversia la formele bacilare a recombinanților. Selecția acestora se face din acest mediu bogat, prin tehnica uzuală a replicilor în plăci („replica plating”), pe diferite medii selective.

Frecvența fuzionărilor eficiente se calculează pe baza frecvenței de complementare. Acest coeficient se determină prin compararea numărului de colonii complementate, care se dezvoltă, spre exemplu, pe medii incomplete, în cazul bacteriilor auxotrofe, cu numărul de colonii „necomplementate”, care cresc numai pe mediul complet, îmbogățit cu toți nutrienții esențiali.

Diploidia în producții clonați ai fuziunii. Hotchkiss și Gabor (1980) au arătat că o mică proporție (1—4%) din producții de fuziune derivați din *B. subtilis* poliauxotrof sînt biparentali, respectiv conțin genomurile neschimbate ale celor doi parteneri ai fuziunii. Un număr apreciabil dintre aceștia pot fi clonați mai multe generații, cu acest caracter biparental.

Fig. 239. — Reprezentarea schematică a evoluției unui proces de fuziune de protoplaști între bacterii care poartă markerii genetici $a^+b^+c^+$ și respectiv $d^+e^+f^+$ (după Alföldi, 1982).



Prezența continuă a celor două genomuri poate fi demonstrată nu numai prin segregarea ulterioară a markerilor lor în subclone, ci și prin capacitatea ADN extras din celulele „biparentale diploide” de a transforma o celulă-receptoare competentă pentru markerii neexprimați în „diploid”. Fenotipul acestor celule în cursul fazei „diploide” nu este prototrof, ci fie al unuia, fie al celuilalt protoplast parental auxotrof. Este probabil că această stare s-ar datora faptului că unul dintre cele două genomuri parentale poate fi moștenit (și deci replicat), fără ca să fie exprimat (Hotchkiss și Gabor, 1983).

Fuziunea protoplaștilor a fost realizată pînă în prezent la *B. subtilis*, *B. megaterium*, la mai multe specii de *Streptomyces*, iar dintre bacteriile Gram-negative la *E. coli* și la *Providencia alcalifaciens*. La microorganismele eucariote a fost realizată la o serie de levuri (*Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* etc.) și la cițiva fungi filamentoși (*Aspergillus*, *Mucor*, *Cephalosporium*, *Penicillium*). Au fost realizate fuziuni interspecifice (*Penicillium chrysogenum* + *P. notatum*), intergenere (*Candida* — *Saccharomycopsis*) și interregnuri (levuri cu eritrocite, fungi filamentoși cu celule animale).

Aplicații practice

Fuziunea de protoplaști este o tehnică de inginerie a genelor la nivel celular cu importanță excepțională pentru biotehnologie, datorită aplicațiilor potențiale multiple. Tehnica are o importanță deosebită pentru microorganismele lipsite de mecanisme naturale de transfer al informației genetice, pe care le face artificial „sexuate” (Alföldi, 1983). Ea oferă posibilitatea

unică de a reuni, într-o singură entitate celulară, două sau mai multe genotipuri diferite, complete, în locul transferului unor fragmente de ADN, ca în transformarea genetică, transducție și conjugare.

Fuziunea de protoplaști poate fi aplicată bacteriilor din genul *Bacillus* pentru creșterea randamentului producției diferitelor enzime (proteaze, amilaze etc.) și celor din genul *Streptomyces*, pentru creșterea randamentului producției de antibiotice sau pentru obținerea de antibiotice noi (prin producerea de noi combinații de gene structurale, care produc antibiotice „hibride”) și de metaboliți secundari cu proprietăți farmacologice importante (Hopwood, 1981).

Aplicarea fuziunii de protoplaști la microorganismele eucariote a dat, de asemenea, rezultate importante. Fermentația berii după tehnologia convențională determină formarea unui produs care conține cantități importante de dextrine, polizaharid nefermentabil. Utilizând tehnica fuziunii de protoplaști, Hockney și Freeman (1980) au obținut un hibrid stabil între tulpina industrială de *Saccharomyces carlsbergensis* și *S. diastaticus*, care produce o bere cu conținut scăzut în dextrine și cu o aromă foarte plăcută. Fukuda și Kimura (1980) au demonstrat posibilitatea utilizării fuziunii de protoplaști pentru transferul selectiv al organitelor (mitocondrii și cloroplaste). În cursul formării protoplaștilor la levurile care înmuguresc, mugurii produc miniprotoplaști anueleați care conțin numai mitocondrii. Ei pot fi ușor izolați și fuzionați cu protoplaștii normali (Altöldi, 1982).

Transfuzia genetică

Ferenczy (1981, 1983) a reunit, sub denumirea de *transfuzie genetică*, toate cazurile în care se realizează transferul selectiv de organite celulare pe calea fuziunii de protoplaști.

În cazul microorganismelor eucariote, fuziunea de protoplaști implică prezența a două sau trei sisteme genetice (respectiv nuclear, mitochondrial și din cloroplaste). Ca urmare, în fuziunea protoplaștilor fungiei, spre exemplu, vor interacționa patru sisteme genetice (două tipuri de nucleu și două de mitocondrii), iar în cazul algelor datorită prezenței cloroplastelor șase tipuri de sisteme genetice. Ferenczy (1981) a demonstrat posibilitatea utilizării fuziunii protoplaștilor pentru transferul selectiv al unor organite (mitocondrii sau cloroplaste). Fukuda și Kimura (1980) au arătat că în cursul formării protoplaștilor la *S. cerevisiae*, frecvent, când levura înmugurește, se pot elibera, din muguri, mici protoplaști care conțin numai mitocondrii. Acești miniprotoplaști, lipsiți de nucleu, pot fi separați cu ușurință și fuzionați cu protoplaști normali. Kawakami și colab. (1981) au demonstrat posibilitatea de transmitere a mitocondriilor sau a cloroplastelor unor alge verzi la levuri, printr-un procedeu similar.

Transformarea genetică a protoplaștilor

Bibo și colab. (1978) au realizat transformarea genetică indușă a protoplaștilor unor tulpini de *Streptomyces* miceliale, care nu sînt normal competente, cu ajutorul ADN plasmidial. După regenerare și reversie, o mare proporție din colonii (~80%) conțineau celule transformate.

Interacțiunea protoplaștilor cu liposomii

Liposomii sînt vezicule artificiale alcătuite din molecule fosfolipidice naturale sau sintetice, aranjate în straturi bimoleculare, ce tind să crească la maximum interacțiunile dintre acizii grași hidrofobi. Adăugarea de colesterol stabilizează membranele liposomale și scade permeabilitatea lor față de soluțiile hidrofile. Deși problema utilizării liposomilor în biologie este de dată recentă, pînă în prezent au fost elaborate cel puțin 8 tehnici conceptual diferite, cu numeroase variații, pentru obținerea lor, după dispersia fosfolipidelor amfipatice într-un mediu apos.

Fig. 240 prezintă schematic una din aceste tehnici, care implică dispersia soluțiilor apoase ce trebuie încapsulate în liposomi, într-un solvent organic nemiscibil (eter—cloroform), care conține fosfolipide dizolvate.

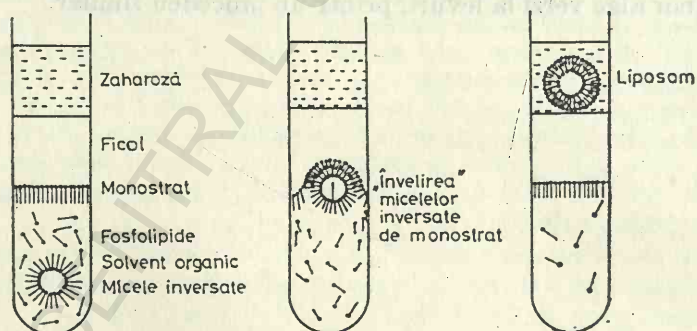


Fig. 240. — Fazele procesului de preparare a liposomilor de la un monostrat fosfolipidic.

În urma dispersiei prin ultrasonare, se formează un număr foarte mare de picături extrem de mici (micele inversate ale fazei apoase stabilizate, prin acoperirea de un monostrat fosfolipidic). După îndepărtarea fazei organice, prin evaporare la presiuni reduse, concentrația micelor inversate crește pînă cînd formează un gel. În această fază, unele micelle inversate sînt destabilizate, eliberîndu-și conținutul apos și obligînd monostraturile lor fosfolipidice învecinate să formeze liposomi (fig. 241).

Prin această tehnică se produc liposomi cu \varnothing cuprins între 0,1 și 1 μm și cu capacitatea de a îngloba un volum de $\sim 10^{-15}$ ml/mg $^{-1}$ (Seoka și Papahadjopoulos, 1978; Menkins, 1983).

Gregoriades și Ryman (1972) au sugerat utilizarea liposomilor ca sisteme de vehiculare a diferitelor medicamente în organisme. Lurquin (1979), Fraley și colab. (1980), precum și Schäffer—Ridder (1982) au demonstrat capacitatea acestor structuri de a îngloba molecule de ADN și de a le introduce în diferite celule procariote, lipsite normal de perete

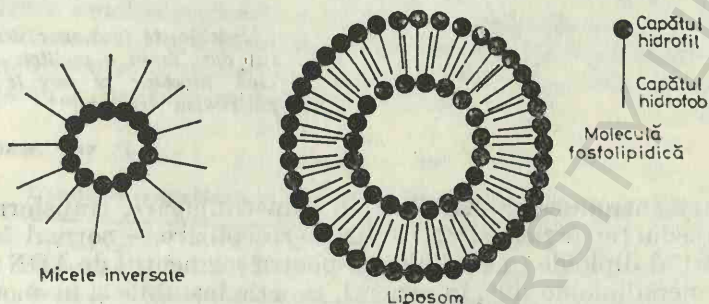


Fig. 241. — Aranjarea moleculelor fosfolipidice în micele inversate și în liposomi.

celular (*Mycoplasma*) sau convertite la starea de protoplaști, sau în celule eucariote (celule animale, protoplaști vegetali sau fungici). Markins și Holt (1981) au demonstrat că ADN cromosomal de la *Streptomyces* inclus în liposomi poate fuziona cu protoplaștii altei tulpini de *Streptomyces*, producând recombinanți la peste 10% din celule pentru fiecare marker examinat. Liposomii au fost folosiți, de asemenea pentru transferul unor plasmide neconjugative la bacterii și la celulele vegetale și chiar pentru transportul unor organite, ca, de exemplu, cloroplastele, din unele celule eucariote la *Neurospora crassa*.

Recombinarea genetică

„Modelele se lasă ușor desenate pe hîrtie, dar devin o realitate numai atunci cînd procesele pe care le reprezintă se pot realiza structural”

P. VON SENGBUSCH

După introducerea ADN străin prin conjugare, transformare genetică, transducție fagică etc., bacteriile-receptoare — normal haploide — devin parțial diploide (merodiploide) pentru segmentul de ADN transferat. Celulele merodiploide sînt, în general, genetic instabile și în mod obișnuit, pierd caracterul nou moștenit. Cu o frecvență mică însă, aceste celule pot suferi un proces de recombinare genetică prin care un segment din materialul nou moștenit este schimbat cu o porțiune analogă din cromosomul bacteriei-receptoare. Procesul este universal răspîndit la bacterii, dar este cel mai mult studiat la *E. coli* K12.

Recombinarea genetică este consecința unei serii de fenomene care determină interacțiunea constituentilor din ADN, avînd ca rezultat o modificare în înălțuirea („linkage”) genelor sau a unor părți de gene. După Brooks-Low și Porter (1978), recombinarea produce reasortarea unei serii de nucleotide, care pot apărea, fie într-o moleculă de ADN producînd deleții, inversii, transpoziții sau duplicări, fie între două molecule parentale separate, pentru a produce o moleculă sau două, derivate în parte din fiecare moleculă parentală *.

Recombinarea genetică între moleculele de ADN viral este în mod particular frecventă în cursul infecțiilor mixte și în special în cursul multiplicării fagilor din grupul T. În cursul replicării fagului T4, spre exemplu, se produc fragmentări multiple, urmate de o reasortare a fragmentelor produse, care determină o frecvență ridicată a recombinărilor. În cursul infecției mixte a *E. coli* cu un fag marcat cu ^{32}P și altul nemarcat, în prezența BrdU care îngreuiază ADN născînd, ^{32}P este găsit într-un număr mare de molecule progene, constituite din două catene grele. El nu este distribuit la întîmplare, cum ar fi cazul în cursul reutilizării nucleotidelor, ci este localizat în fragmente reprezentînd 5—10 % din lungimea genomului fagic. Aceasta demonstrează prezența unor fragmente întregi din genomul parental care se găsesc dispersate și integrate în moleculele progene. Pe această bază, recombinarea ADN fagic a permis lămurirea multor aspecte moleculare ale acestui proces, ca și elaborarea unor modele privind etapele sale principale.

* După o definiție astăzi anacronică, recombinarea genetică a fost definită drept procesul combinat de transfer al ADN de la o bacterie la alta și stabilirea ulterioară a unei părți din informația genetică în celula-receptoare (Lederberg, 1955). Cele două procese sînt fundamental diferite. Recombinarea este un epifenomen posibil, dar nu obligatoriu, al transferului de material genetic.

Clasificare. Au fost descrise trei tipuri de recombinare genetică :

1) *Recombinarea genetică generală*, prezentă în diferite variante, fapt care explică și numărul mare de denumiri (*recombinare generalizată, normală, legitimă, rec-dependentă, nespecifică, egală, ecuațională, vegetativă (la fag) sau, simplu, recombinare*). Ea reprezintă schimbul unor segmente de ADN dependent la *E. coli* de proteina Rec A, care apare când gradul și extinderea omologiei genetice între moleculele parentale care interacționează este mare. După Brooks-Low și Porter (1978), omologie înseamnă identitate de secvențe nucleotidice, cu o îngăduință pentru rarele excepții corespunzând situsurilor mutaționale.

Tabelul nr. 31

Tipurile de recombinare genetică (după Brooks-Low și Porter, 1978)

Tipul de recombinare	Criterii	Exemple
Generală	Grad ridicat de omologie genetică; punct de cros-singover obișnuit la întimplare; dependentă de funcțiile Rec sau similare celor Red.	Transformare genetică; transducție generalizată; conjugare $Hfr \times F^-$; mobilizarea cromosomului în tulpinile <i>F'-prim</i> secundare.
Situs specific unic	Specificitate de situs numai pentru una din moleculele de ADN parentale; omologie foarte limitată sau absentă; rata depinde de particularitățile sistemului.	Insertia fagului Mu; inserții și deleții produse de transpozoni și de secvențele de inserție; inserția plasmidei F pentru a forma anumite tulpini Hfr; formarea factorilor F.
Situs specific dublu	Specificitate de situs pe ambele molecule de ADN parentale.	Integrarea normală și excizia fagului λ ; inserția plasmidei F pentru a forma anumite tulpini Hfr; integrarea anumitor transpozoni.
Nelegitimă	Omologie foarte limitată sau complet absentă; absența specificității de situs; frecvență foarte mică.	Duplicări; deleții (excepție cele care implică intervenția SI sau Tn); formarea anumitor factori F-prim sau fagi transductori specializați; fuziunea unor molecule de ADN cu extremități neomologe.

2) *Recombinarea la situs specific*, numită și *specifică, specială, localizată, integrativă, rec-independentă, aditivă, specializată*, se poate produce între molecule de ADN cu un grad mic sau lipsite de omologie. Ea are însă o poziție evident preferată pentru anumite situsuri situate pe una sau pe ambele catene parentale. A fost descrisă inițial pentru a caracteriza integrarea și excizia fagului λ în cromosomul *E. coli*, în care poziția de

crossover este precis localizată pe ambele molecule, adică este specifică pentru două situsuri. În concepția modernă, definiția are un cadru mai larg decât cea originală, pentru a include și recombinarea condiționată de prezența unui situs specific unic (în cazul fagului Mu).

3) *Recombinarea „nelegitimă”*, numită și *aberrantă, improprie, neomologă, inegală, neobișnuită, neecuațională*, are, în prezent, cadrul conceptual cel mai confuz. A fost descrisă inițial pentru a caracteriza interacțiunea dintre genofori, în care nu este implicată nici omologia extensivă, nici specificitatea de situs (de exemplu, formarea particulelor de fag transducător specializat prin excizie eronată, integrarea la întimplare a fagilor, la situsuri secundare), în cazul lipsei, prin deleție, a situsurilor specifice de integrare, pentru integrarea, deleția sau inversia fagului Mu și a Tn, care nu necesită un grad important de omologie. Cercetări recente au arătat că multe din sistemele de recombinare declarate inițial ca nelegitime sau aberante s-au dovedit a fi cu specificitate de situs. În plus, în unele cazuri, prezența larg răspândită în genom a unor secvențe care seamănă cu situsurile asupra cărora acționează restricțiile poate „legitimize” recombinarea prin împerecheri cu omologie minimală. Confuzia decurge din faptul că noțiunea de recombinare nelegitimă este folosită în prezent atât în accepția originală, cit și în cea restrictivă, în funcție de domeniul de preocupare al diferiților cercetători. De aceea, tabelul nr. 34, elaborat în această concepție modernă, prezintă sub raportul recombinării nelegitime, unele contradicții cu punctele de vedere ale specialiștilor în domeniul elementelor genetice transpozabile.

Mecanismele recombinării genetice

Au fost propuse trei modalități ipotetice de producere a recombinării genetice :

1) *Modelul „rupere—reunire” („breakage—reunion”)*, derivat în mare măsură din studiile genetice efectuate pe bacteriofagi, preconizează ca prim eveniment al recombinării ruperea celor două genomuri parentale situate la nivele similare pe ambele molecule de ADN. Ulterior, fragmentele rezultate se reunesă încrucișat, prin crossingover pentru a forma un genom recombinant. Recombinarea nu depinde de molecule de ADN nou sintetizate, ci provine integral din moleculele de ADN parentale, deoarece informația genetică este mai degrabă transferată între cele două genomuri parentale.

Foarte agreat inițial, acest model este contrazis de unele observații privind recombinarea la virusuri (Burns, 1976). Studiile efectuate pe mutante fagice au arătat însă că recombinanții se pot forma în prezența inhibitorilor sintezei ADN, ceea ce demonstrează că pentru recombinare, replicarea nu este necesară.

2) *Modelul „copierii alternative”* sau al „alegerii modelului” („complete copy-choice”) postulează că nu ar exista nici un schimb de ADN între genomul donatorului și cel al receptorului, și că sinteza moleculei de ADN nou, în cursul replicării, s-ar face folosind alternativ ca matriță o catenă de ADN de la donator și alta de la receptor (fig. 242). Ca urmare,

Într-una din catenele ADN nou sintetizat, o secvență de nucleotide a avut ca model nu segmentul corespunzător din ADN propriu, ci secvența omologă din ADN exogen. În conformitate cu această ipoteză, cromosomii recombinanți sint integral sintetizați *de novo* și nu rezultați din reunirea încreșată a unor fragmente din cromosomii parentali preexistenți, așa cum sugerează ipoteza rupere—reunire.

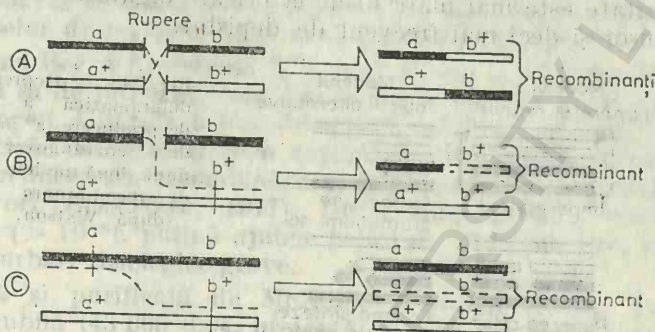


Fig. 242. — Mecanismele, teoretic posibile, de recombinare genetică. A. Rupere și reunire. B. Ruperea unui cromosom, urmată de copierea celui alt (— — —). C. Copiere alternativă (după Strickberger, 1976).

Bazată pe observația citologică a formării chiasmei, pe unele date genetice de transmitere a caracterelor în sistemele eucariote și pe caracterul conservativ al replicării ADN, această ipoteză este infirmată de: a) demonstrarea caracterului semiconservativ al replicării ADN și b) de faptul că recombinarea se poate produce în absența replicării.

Deși infirmate de o serie de date mai noi, aceste două modele, menționate încă din anul 1954 de Delbrück și Stent, și-au păstrat valoarea euristică și în prezent.

3) Modelul „rupere și copiere” („breakage and copying”) preconizează formarea cromosomului recombinant prin secționarea fizică a unui genom parental și copierea celui alt. Prin acest mecanism, în cazul existenței a doi cromosomi parentali alcătuiți, din segmentele *ab* și *a+b+* se poate forma un cromosom recombinant în care segmentul *a* dintr-un cromosom să devină legat de un segment *b+* nou sintetizat, după segmentul corespunzător al celui alt. După Kornberg (1980), motivul biochimic de bază al recombinării genetice rămâne ruperea și reunirea, atât la procariote, cât și la eucariote, dar realizarea lui se poate face printr-o mare variație de căi și mecanisme biochimice (fig. 243).

Recombinarea reciprocă și nereciprocă. Modelele pentru eucariote sint bazate pe principiul recombinării reciproce, care implică schimbul unor segmente de ADN cu lungimea absolut identică (fig. 244), în timp ce modelele pentru procariote, fără a exclude posibilitatea schimburilor de tip reciproc, presupun nereciprocitatea, ca fiind mai obișnuită. Aceste date confirmă afirmația lui Bodmer (1970), care a arătat că recombinarea eucariotelor este aproape totdeauna reciprocă*, deoarece implică geno-

* Recombinarea nereciprocă a fost descrisă la *Neurospora*, sub denumirea de conversia genelor.

murile complete ale celor doi parteneri. În schimb, la procariote, ea este aproape totdeauna asimetrică, deoarece implică, în special după transformare, transducție, conjugare etc., o contribuție mai mare a unui partener (bacteria-receptoare) și mai mică a celuilalt (donatorul). După Birge (1981), această diferență pare a fi mai mult artificială decât reală, decurgind din numărul mare de markeri identificați pe harta genetică a *E. coli* (a căror densitate este mai mare decât la oricare organism eucariot), care îi face mai ușor și deci mai frecvent de depistat.

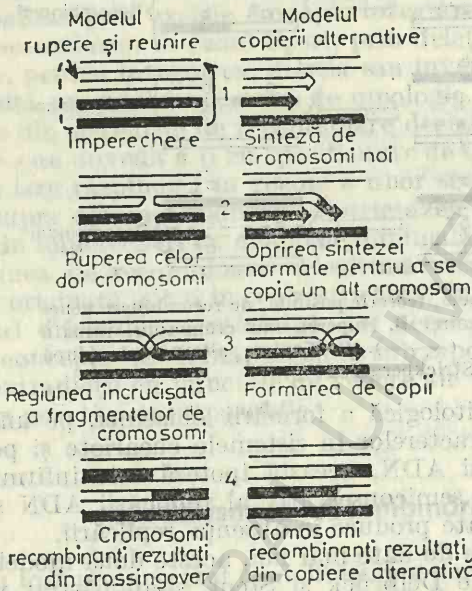
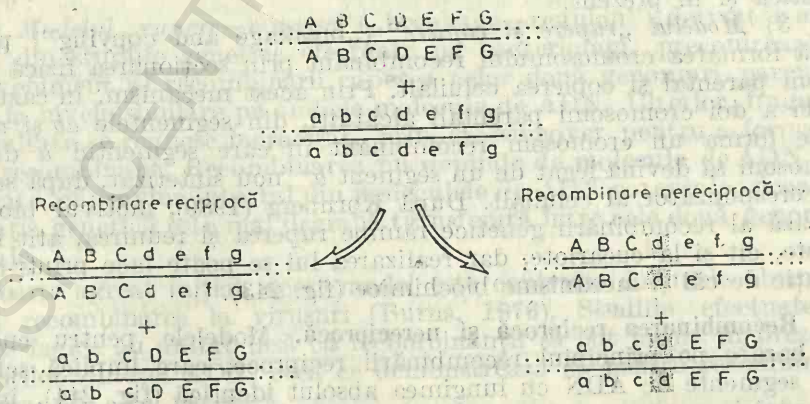


Fig. 243. — Reprezentarea diagramatică a etapelor de producere a procesului de crossingover (1—4) după două modele generale de recombinare genetică (după Watson, 1974).

Fig. 244. — Recombinarea reciprocă și nereciprocă. Fiecare linie reprezintă o catenă de ADN și fiecare literă, un anumit marker genetic. În raport cu markerii ABC și EFG, ambele procese sunt reciproce. Nereciprocitatea se observă numai în raport cu markerul D (după Birge, 1981).



Unitatea de recombinare. Cercetările lui Benzer (1957) efectuate pe fagul T4 au demonstrat că cea mai mică unitate de recombinare (de crossingover), denumită *recon*, este reprezentată de o singură pereche de baze. Ea poate fi situată în orice regiune de-a lungul moleculei de ADN, intra-genic sau intergenic.

Proteine și factori implicați în recombinare. Mecanismul recombinării genetice generale este foarte complex și depinde de o serie de produși ai unor gene specifice, dintre care unii sînt proteine cu funcții-cheie în replicarea și repararea ADN (Arber, 1979). De altfel, după von Sengbusch (1979), recombinarea și reparatia ADN au multe trăsături comune și sînt în mod cert numai două fațete ale unei medalii. Recombinarea genetică este condiționată de participarea mai multor proteine ca : *Rec A*, *Rec B*, *Rec C*, proteine de legare a ADN m.c. topoizomerase etc.

Proteina *Rec A* („proteina X”) de la *E. coli* a fost cunoscută inițial prin funcția sa de protează, care determină *in vitro* clivarea represorului λ adăugat exogen. Ulterior, a fost descoperit rolul său esențial, în recombinarea genetică, demonstrat prin capacitatea mutațiilor la nivelul genei *rec A* de a reduce rata recombinărilor, după conjugare sau transducție de $\sim 1\,000$ de ori (Eisenstark, 1977). După Birge (1981), reducerea este mai masivă ($> 10^{-6}$), putînd ajunge la nivele nedetectabile, și este însoțită de perturbări fiziologice grave.

Isolată și purificată de McEntee și colab. (1977), *RecA*, este o proteină solubilă (43 000 dal), prezentă în mod normal în cantități mici (2 000 molecule/celulă ; Cox, 1981), datorită funcției de represor a proteinei *Lex A*. Această cantitate redusă este suficientă însă pentru a cataliza legarea obligatorie a catenelor înainte de recombinare. În aceste condiții, activitatea proteolitică este nesemnificativă. Cînd un inductor încă nedeterminat se leagă de ADN, cantitatea de proteină *Rec A* crește ($\sim 80\,000$ molecule/celulă ; Gudas și Pardee, 1977) și se activează funcția sa proteolitică. Ca urmare, genele *rec A*, *uvr A* și altele funcționează intens.

Rolul complex al proteinei *Rec A* a fost scos în evidență de caracterul foarte pronunțat pleiotrop al mutațiilor la nivelul genei *rec A*. La aceste mutante, pe lîngă scăderea marcată a ratei de recombinare genetică, se observă o creștere a sensibilității la UV, incapacitatea de inducție a sistemului reparator SOS și de inducție litică a fagului λ , incapacitatea de a produce intermediari-cheie ai recombinării genetice și legături heteroduplex, precum și o scădere a viabilității celulelor ($\sim 50\%$ din normal) (Dressler și Potter, 1982). Nu se știe în ce mod o singură proteină poate cataliza funcții și reacții atît de disparate, ca proteoliza și recombinarea catenelor ADN, și ce semnificație fiziologică și evolutivă are acest fenomen. După Morand și Devoret (1977), proteina *Rec A* ar acționa alternativ ca o enzimă constitutivă (în recombinare) sau ca una inductibilă.

Enzima *Rec BC* este o proteină formată la *E. coli* din mai multe subunități, produs ale genelor *rec B* și *rec C* (Tomizawa și Ogawa, 1972), identificată inițial ca o foarte activă exo- și endonuclează, dependentă de hidroliza ATP (Goldmark și Linn, 1970). Mutațiile la nivelul genelor respective reduc substanțial rata recombinărilor, dar nu așa de evident ca în cazul celor în gena *rec A*.

După concepția devenită clasică proteina *Rec BC* ar fi implicată în terminarea și/sau separarea moleculelor reunite, în excizia reparatorie și în eliminarea variatelor „cozi” de ADN m.c., ale diferiților intermediari ai recombinării și replicării. După Dressler și Potter (1982), funcțiile recent descoperite ale proteinei *Rec BC* asupra ADN sînt mai semnificative pentru rolul ei în recombinare, decît cele descrise anterior. Incubată cu ADN

d.c. și ATP în prezența proteinelor de legare a ADN m.c., proteina *Rec BC* acționează în special pentru a derula molecula duplex a ADN, expunând regiuni monocatenare, fie la extremitățile acesteia, fie în mijlocul ei, fie în ambele, favorizând formarea unor bucle monocatenare. Proteina *Rec BC* ar iniția recombinația genetică, circulând de-a lungul moleculei de ADN d.c., creînd o regiune denaturată local, în care mai multe mii de pb ale catenelor $\ll + \gg$ și $\ll - \gg$ ale ADN sînt menținute separate în așa fel încît suprafețele lor de legare prin H vor fi expuse (Telander—Muskatovitch și colab., 1980). Regiunile monocatenare expuse devin catene potențial donatoare în recombinație. În această reacție, proteina *Rec BC* acționează împreună cu proteinele de legare a ADN m.c. (și posibil cu însăși proteina *Rec A*) al căror rol este de a stabiliza catenele separate. „Acoperirea” ADN din regiunea buclelor m.c. ar putea fi prima fază în activarea ADN m.c., pentru „a invade” o dublă helice (Williams și colab., 1980). Ghidate de proteina *Rec A*, buclele de ADN m.c. „acoperite” vor căuta o regiune de omologie în duplexul receptor, pe care o vor „ataca pentru a o invade”. Cînd alinierea regiunilor omologe s-a realizat, ADN topoizomeraza va suprapune catenele recombinante pentru a forma un intermediar de replicare stabil (Dressler și Potter, 1982).

Un rol întrucîtva similar ar avea proteina genei 32, izolată din *E. coli* infectată cu fagul T4 (Huberman și colab., 1974). Ea stabilizează cele două catene, facilitînd replicarea și recombinația, acționînd ca *derulază* („unwinding protein”) sau ca o *proteină-fermoar* („Reissverschluss-protein”) (Sengbusch, 1979).

Potter și Dressler (1980) au izolat de la *E. coli* enzima ADN sinaptaza (gr. sinaptein = a lega împreună), care *in vitro* fuzionează atît moleculele de ADN d.c., la nivelul unei regiuni de omologie genetică, cît și o moleculă de ADN m.c., cu un duplex de ADN omolog. Ea are rol în etapele timpurii ale recombinației genetice și în geneza intermediarilor Holliday, ca și în recombinația reparatorie a ADN lezată.

Modele moleculare ale recombinației genetice

Problema bazelor moleculare ale recombinației a avut o evoluție paradoxală în sensul că pe măsură ce acestea au fost aprofundate, modelul simplu, conceptual acceptabil, valabil în jurul anului 1970, a devenit nesatisfăcător (fig. 245). Au fost elaborate peste 25 de modele ipotetice, originale sau variante, care sînt prezentate pe rînd, într-o lucrare sau alta, drept cele mai adecvate, în funcție de punctul de vedere al diferiților autori.

Modelul lui Holliday

Imaginat în anul 1964 și modificat în mai multe variante (1974), pe baza progreselor teoretice și experimentale, modelul lui Holliday este considerat de Dressler și Potter (1982) drept cel mai acceptabil, pe baza datelor obținute la *E. coli*, probabil extrapolabile atît la celelalte procariote, cît și la eucariote. După acest model, procesul este inițiat de „alinieră” celor două molecule parentale de ADN linear (fig. 246 a); urmată

de incizarea exactă a unei catene din fiecare duplex de către o endonuclează, la nivelul unei regiuni date (b). Ulterior, o derulază eliberează cele două regiuni monocatenare (c). Extremitățile libere astfel create părăsesc catenele complementare de care erau legate prin legături de H și se asociază între ele (d, e). Rezultatul acestui schimb reciproc de catene este stabilirea unei conexiuni fizice temporare, sub forma unei punți între cele două molecule de ADN inițiale pe care să se recombine și formarea unui heteroduplex de ADN. Stabilizarea acestei structuri poate fi făcută prin intervenția mecanismelor de reparație a ADN și a ADN ligazei. Rezultă structura caracteristică descrisă sub denumirea de *intermediarul Holliday* (e).

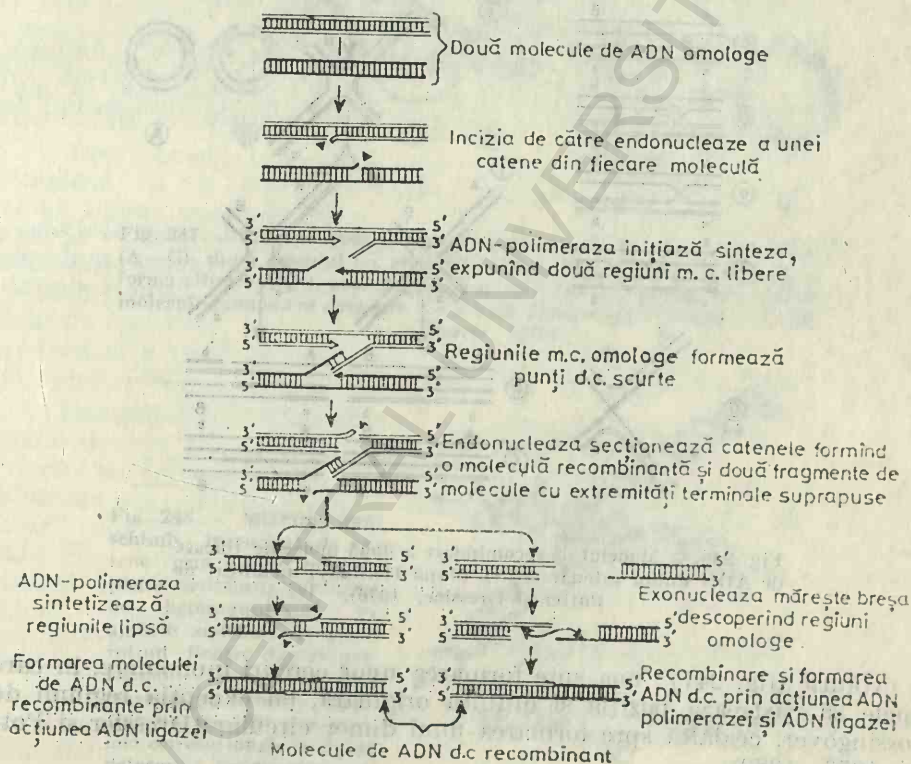


Fig. 245. — Modelul clasic de producere a procesului de recombinație genetică (după Watson, 1974).

Dovezi privind existența intermediarului de recombinație Holliday. Deși modelul original al lui Holliday a fost propus pe baza studiilor genetice la eucariote, primele dovezi fizice și biochimice au fost aduse de studiile efectuate asupra moleculelor mici de ADN, active în sistemele procariote. Ele au permis izolarea și caracterizarea intermediarilor recombinanți produși de fagii λ , Φ X 174, S 13 și de plasmidele Col El, care utilizează aparatul de recombinație al celulei-gazdă, *E. coli*. Întrucât moleculele de ADN ale acestora sînt circulare (spre deosebire de cele lineare de la

eucariote), era de așteptat ca intermediarii de recombinare să aibă aspectul cifrei 8, fapt confirmat prin microscopie electronică (Benbow și colab., 1975; Valanzuela și colab., 1975). Acești intermediari au două posibilități

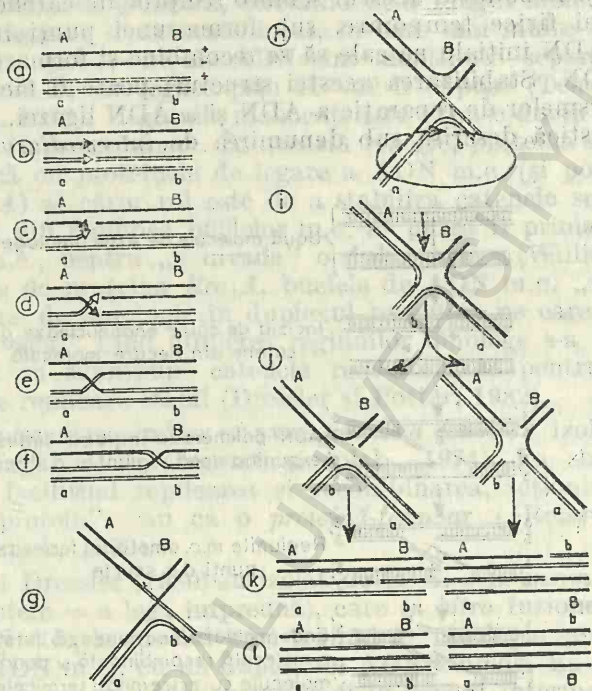


Fig. 246. — Modelul de recombinare a două molecule lineare de ADN dublu catenar (a—l) (după Holliday, modificat de Potter și Dressler, 1976).

de evoluție (fig. 247): una spre formarea unor cercuri monomere, în care genele își păstrează poziția și ordinea originară, cu excepția regiunii de crossingover, cealaltă spre formarea unui dimer circular (Dressler și Potter, 1976, 1982).

Evidențierea formelor chi. Deși geometria formelor 8 este foarte sugestivă pentru recombinare, ea poate fi realizată teoretic pe mai multe căi: 1) prin cuplarea a două cercuri, ca verigile unui lanț; 2) prin existența unui cerc cu lungime dublă, răsucit accidental în regiunea de mijloc; 3) prin legarea covalentă a două genomuri, într-o regiune de omologie, în cazul recombinării. Pentru a elimina această ambiguitate, Potter și Dressler (1978) au incizat intermediarul în formă de 8, înainte de examinarea prin microscopie electronică, cu ajutorul unei restrictaze (Eco R1), care taie la un situs unic. Teoretic, în primele două cazuri, rezultatul elivării trebuia să fie formarea a două unități lineare, separate, cu dimensiunile unităților inițiale („unit-size rods”). În realitate, deoarece structurile

în formă de 8 sint rezultatul conectării a două molecule circulare, enzima lasă punctul de fuziune intact și convertește forma de 8 într-o structură dimeră, bilateral simetrică, cu forma literii grecești chi (χ).

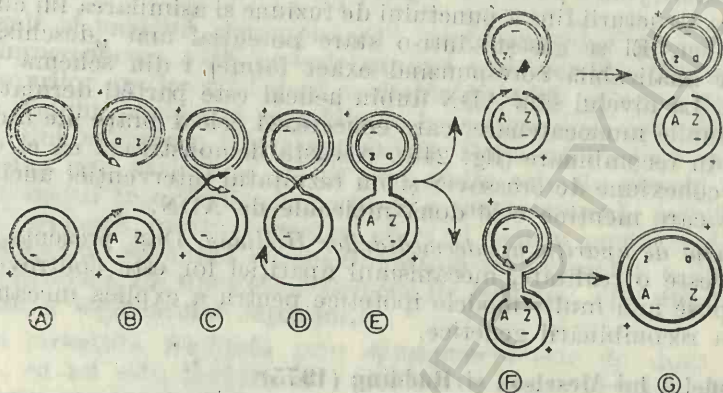
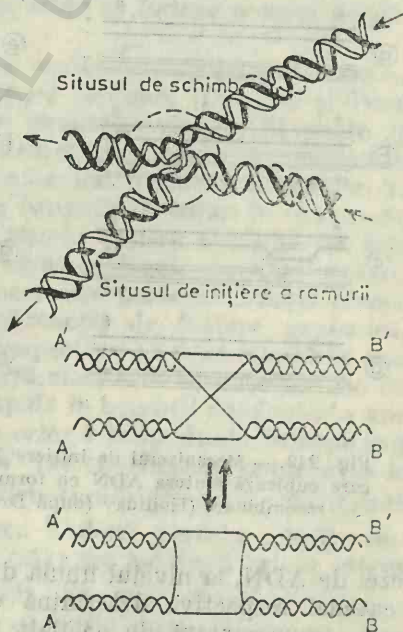


Fig. 247. — Etapele recombinării între două molecule de ADN circulare (A—G), după modelul lui Holliday. După formarea unei structuri cu forma cifrei opt (E), evoluția poate urma două căi: producerea a două molecule monomere circulare sau a unui dimer circular (după Dressler și Potter, 1982).

Fig. 248. — Migrarea unui schimb încrucișat de catene prin difuzie rotativă poate determina formarea de heteroduplexuri pe ambele molecule de ADN; rotind fiecare duplex participant în același sens (sus) (după Broker, 1977). Rotația cu 180° a diagramei convenționale în zigzag determină producerea unei structuri în formă de pătrat (după Watson, 1977).



Formele chi prezintă un tip special de simetrie, deoarece punctul de contact dintre cele două genomuri apare ca și cum ar divide moleculele respective într-o structură cu două perechi de brațe, având fiecare lungimi egale. Punctul de fuziune este echidistant față de punctul de clivare al

restrictazei pentru fiecare pereche de brațe, ceea ce arată că el marchează o anumită secvență de baze, și este în mod necesar într-o regiune de omologie genetică.

Structura fină a punctului de fuziune. Microscopia electronică a permis observarea structurii fine a punctului de fuziune și asimilarea lui cu punctul de crossover. El se găsește într-o stare potențial mai „deschisă”, cu o geometrie analizabilă corespunzând exact formei *i* din schema teoretică (fig. 246). La nivelul său, ADN dublu helical este parțial derulat, evidențiind regiunile monocatenare, care conectează cele 4 brațe ale moleculelor angajate în recombinare (fig. 248). Aceasta demonstrează că el este realmente o conexiune de crossover și nu rezultatul intervenției unei proteine sinaptice care menține cele două molecule de ADN.

Modul de apariție a intermediarilor Holliday. Deși prezența formelor 8 și chi este o realitate, mecanismul apariției lor este controversat. Au fost propuse mai multe modele ipotetice pentru a explica mecanismul de inițiere a recombinării genetice.

Modelul lui Meselson și Radding (1975)

Acest model este bazat pe ideea formării intermediarului Holliday, cuplat cu sinteza ADN. El presupune că după alinierea celor două molecule de ADN parentale (fig. 249, a) are loc incizia unei catene, urmată de ini-

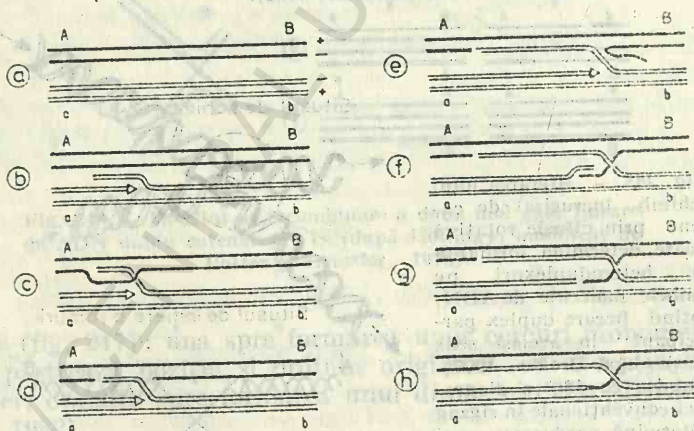


Fig. 249. — Mecanismul de inițiere Meselson—Radding (a—h), care cuplează sinteza ADN cu formarea unor intermediari de recombinare (Holliday (după Dressler și Potter, 1982).

țierea sintezei de ADN, la nivelul unuia din segmentele create în acest fel. Creșterea catenei respective determină deplasarea unei „cozi” („tail”) de ADN m.c. (reprezentată de celălalt segment rezultat din incizie) și „invadarea” celei de-a doua molecule de ADN d.c. parental, pentru a forma un heteroduplex în regiunea de omologie genetică (c, d). Procesul continuă determinând, până la urmă, o incizie pe duplexul celălalt, urmată de invazia catenei, care se produce într-un situs puțin diferit, pentru a

produce o a doua regiune heteroduplex mai scurtă (e—g). După „plombarea” breșelor, care au rezultat și eliminarea „cozilor” de ADN în exces, va lua naștere un intermediar Holliday cu regiuni heteroduplex asimetrice.

Modelul lui Dressler și Potter (1982)

Numit și modelul „suprapunerii” („interwrapping model”), presupune că împerecherea ADN precede ruperea catenelor (fig. 250 a). Fuziunea genomurilor are loc când două molecule de ADN suferă o denaturare locală, în regiuni omologe și perechile de baze expuse ale catenelor $\ll + \gg$ și $\ll - \gg$ sint suprapuse („interwrapped”). După un contact inițial (b), suprapunerea este extinsă (c, d) pe mai multe sute de perechi de baze. O serie de incizii tranzitorii, efectuate de o topoizomerază, permit rotația catenelor, necesară pentru formarea elicei și pentru continuarea suprapunerii. Structura rezultată este caracterizată prin prezența a două conexiuni de crossover, de tipul celor propuse de Holliday, câte una la fiecare extremitate a segmentului suprapus.

Deși structura rezultată prin suprapunere este de două ori mai complexă, ea nu este fundamental diferită de cea propusă de Holliday, cu un singur crossover. Maturarea acestui intermediar este realizată prin aceleași evenimente care au fost propuse în modelul originar tip Holliday. Deosebirea esențială dintre cele două modele descrise rezidă deci în faptul că modelul Meselson—Radding postulează formarea unei singure joncțiuni de crossover, în timp ce modelul „suprapunerii”, bazat pe intervenția inițială a unei topoizomeraze, duce la formarea unui dublu crossover (Dressler și Potter, 1982).

Esențial este faptul că mai multe modalități pot explica plauzibil modul de formare al intermediarilor Holliday (Dressler și Potter, 1982). Punctul de încrucișare nu este o structură statică. El poate migra prin difuziune circulind de-a lungul moleculelor, printr-un mecanism „de fermoar” (migrarea ramurilor), determinând o mărire a zonelor hibride inițiale. Deși după modelul originar apariția inciziilor în cromosomii recombinanți este considerată ca un stimul pentru reacțiile de schimb între catene, împerecherea omologă a două molecule de ADN poate apărea și prin intervenția unei topoizomeraze, care poate determina formarea intermediarului Holliday (e) printr-o reacție de fuziune genomică, în care ruperea și reunirea genomurilor respective ar fi efectuată în mod concertat (Dressler și Potter, 1982). Particularitățile structurale ale intermediarului Holliday permit formarea rapidă în condiții fiziologice a unor regiuni de ADN hibrid, corelat cu rotația celor 4 brațe dublu helicale în jurul axului lor cilindric (h, i). „Maturarea” intermediarului poate avea loc în continuare datorită simetriei sale structurale pe două căi înrudite (i—1), fiecare putând determina formarea a două perechi diferite de recombinanți, după cum clivarea lor (fig. 251) are loc după un ax est-vest (transversal) sau nord-sud (longitudinal). Etapele următoare sint „tăcute”. Ele implică hidroliza fragmentelor de ADN în exces, de către o exonuclează, sinteza regiunilor lipsă de ADN polimerază, sudarea fragmentelor de o ligază, excizia și „repararea” bazelor împerecheate greșit și formarea unor molecule recombinante, conținând regiuni hibride.

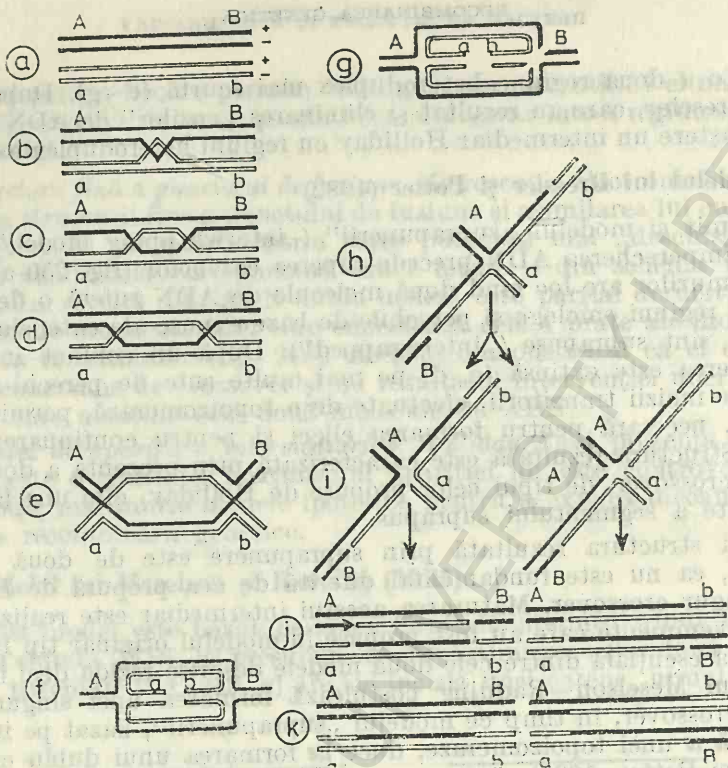


Fig. 250. — Prototipul unui model de recombinare a ADN în care intermediarul de recombinare se formează prin împletirea (suprapunere) catenelor de ADN complementare după denaturarea localizată a celor două helice în regiunea de omologie (a—k). În acest tip de inițiere nu este implicată sinteza de ADN (după Dressler și Potter, 1982).

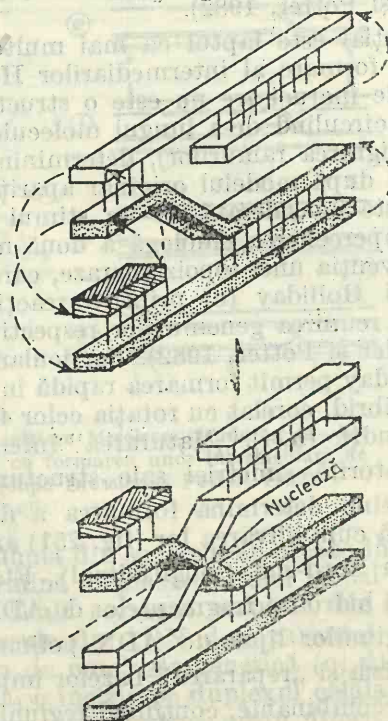


Fig. 251. — Formarea moleculelor de ADN recombinante prin izomerizarea unui intermediar asimetric de recombinare. Moleculele recombinante se formează prin rotația unui set de brațe cu 180° în jurul unui ax paralel față de ele. Regiunile heteroduplex pe ambele molecule sînt produse prin difuzia rotatorie a catenei încrucișate. Final, ele sînt separate prin acțiunea unei nucleaze (după Joklik, 1976).

Recombinarea la situs specific

Necesitând o omologie considerabil mai mică și cu localizare limitată, recombinația la situs specific are drept componente esențiale una sau mai multe enzime specifice pentru o anumită secvență din ADN și două molecule de ADN d.c., dintre care cel puțin una poartă secvența de baze recunoscută de enzimele respective. În condiții adecvate se produce o recombinație reciprocă sau aproape reciprocă la nivelul secvențelor de recunoaștere sau adiacent lor. Este de două tipuri:

Recombinarea la situs specific dublu

(„double site specific recombination”).

Numită și *recombinație integrativă* (Shapiro, 1979), este tipică în cazul fagului lambda, a cărei integrare în cromosomul *E. coli* este condiționată

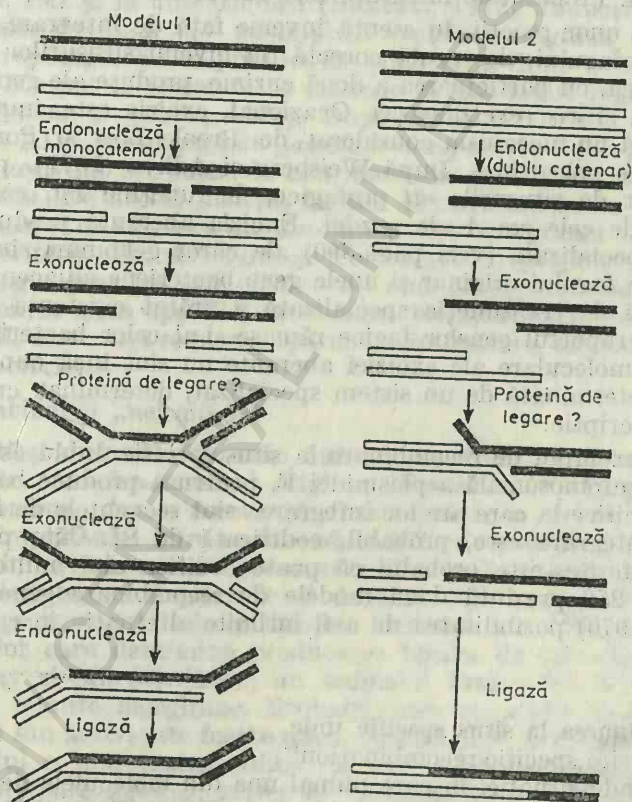


Fig. 252. — Modele de recombinație genetică la bacteriofagi. Modelul 1. Incizia m.c. a ADN d.c. parental permite împerecherea celor două molecule parentale, urmată de extinderea regiunii hibride formate. Final, endonucleazele atacă punctele în care sînt reunite ramurile de regiunea hibridă, lăsînd numai o moleculă de ADN d.c. recombinantă (heteroduplex). Modelul 2. Fragmentele rezultate din secționarea moleculelor de ADN d.c. parentale sînt atacate de exonucleaze, care produc extremități m.c. ce se împerechează pentru a forma o regiune hibridă, care este alungită după îndepărtarea nucleotidelor adiacente prin acțiunea exonucleazei. Ca și în modelul 1, etapa finală implică formarea unei molecule continue prin acțiunea ADN ligazei (după Clark, modificată de Strickberger, 1976).

de prezența a două situsuri specifice. Situsul de legare bacterian *BOB'* are ~250 pb, iar cel fagic *POP'*, 317 pb (Arber, 1979). Dintre acestea, numai 15 baze formează regiunea de omologie (5'-GCTTTTATATACTAA-3'), notată cu „O”, care reprezintă situsul de acțiune al enzimei integrază (*int*) codificată de fag (Landy și Ross, 1977). Recombinarea are loc între situsurile de legare/recombinare *att POP'* („attachement”), situat pe genomul fagic și *att BOB'* situat pe cromosomul bacterian (în poziția 17 minute pe harta genetică de conjugare) printr-un crossover specific mediat de integrază. Rezultatul integrării este producerea unui profag, având la extremitățile sale situsurile hibride *BOP'* și *POB'*.

Integrarea ar necesita și intervenția a două proteine bacteriene termostabile, codificate de genele *hid* (*him*, A) și *hip*, a căror funcție nu este cunoscută. Procesul de integrare este reversibil.

Datorită unor reacții, în esență inverse față de integrare, pot avea loc excizia profagului, de regulă corectă (la nivelul situsurilor amintite), și inducția litică, cu participarea a două enzime, produse ale genelor fagice *int* (integrază) și *xis* (excizionază). Ocazional, excizia este imprecisă sau aberantă, după un mecanism considerat de Brooks-Low și Porter (1978) ca recombinație nelegitimă. După Weisberg și Adhya (1977), procesul ar fi independent de situsurile *att* profagice, de funcțiile *int*, *xis* sau *red* λ fagice, ca și de cele *rec A* ale gazdei. Excizia aberantă produce fagi de transducție specializată (vezi pag. 390) ale căror genomuri sunt compuse din secvențele fagului originar și unele gene bacteriene adiacente. Studiul diferiților fagi de transducție specializată a arătat existența unor mari deosebiri sub raportul genelor fagice rămase și al celor bacteriene substituite. Bazele moleculare ale exciziei aberante nu sunt încă cunoscute. Ea ar putea fi determinată de un sistem specializat, determinat cromosomal, dar fenotipic criptic.

Un alt exemplu de recombinație la situs specific dublu este furnizat de integrarea cromosomală a plasmidei F, pentru a produce bacterii Hfr. Situsurile specifice la care are loc integrarea sunt secvențele de inserție SI. Enzima de integrare este, probabil, codificată de SI. Cum plasmida F conține SI diferite, este probabil că poate codifica mai multe integreze diferite. Fig. 252 prezintă două modele de recombinație genetică având după Clark (1976) posibilitatea de a fi întâlnite alternativ în cazul fagilor în general.

Recombinarea la situs specific unic

(„single site specific recombination”)

Corespunde situației în care numai una din moleculele de ADN d.c. trebuie să poarte secvențe de recombinație. După Birge (1981), ea este tipică în cazul transpozonilor propriu-ziși, al fagului Mu și al integrării plasmidei R 100 pentru a produce bacterii Hfr.

Deoarece omologia segmentelor recombinate este foarte mică sau nulă, înainte de descoperirea secvențelor de inserție (SI), aceste tipuri de recombinație erau numite „nelegitime”. De altfel și în prezent, cercetători importanți în domeniul elementelor genetice transpozabile consideră recombinațiile induse de acestea ca „nelegitime” (Cohen și Shapiro, 1980).

În contrast cu aceștia, specialiștii în problema recombinației genetice consideră că aceste fenomene sînt în realitate recombinații la un situs specific unic, catalizate de SI, care flanchează diferiții Tn. Prin acest mecanism, spre exemplu, Tn 10, care codifică rezistența la tetracelină, se deplasează la diferite bacterii și fagi atît intramolecular, cît și de la o moleculă de ADN la alta. El determină, totuși, un tip neobișnuit de recombinație, deoarece, în acest caz, transpoziția implică replicarea Tn, care se inseră la un situs nou, menținîndu-se la cel original. Inserția se face cu o mare precizie, deoarece porțiunile terminale ale SI 10, care îl flanchează, sînt totdeauna identice (Birge, 1981). El este capabil de excizie precisă, dar poate induce și deleții adiacente situsului de inserție.

Fagul Mu a fost considerat inițial capabil de recombinație „nelegitimă”, datorită capacității lui de a se insera aparent în orice situs cromosomal la *E. coli* și la alte bacterii (Bukhari, 1972). Inducția lui litică — spre deosebire de fagul λ — nu implică excizia profagului, ci este condiționată de replicare. Ea se produce la scurt timp după ce 6—8 copii noi ale fagului Mu pot fi detectate ca inserate în mai multe regiuni cromosomale (Waggoner și colab., 1974). După Bukhari (1976), recombinația dintre Mu și ADN bacterian este „asociată cu replicarea” („replication-associated”) și activată cel puțin de una, dacă nu de ambele extremități ale profagului Mu. De aceea, inserția fagului Mu are loc la un situs specific unic, reprezentat de regiunea din Mu implicată în integrarea în ADN străin. Pe aceste criterii, Brooks—Low și Porter (1978) propun — deși uzajul în terminologia genetică este altul — un sens conceptual mai larg pentru recombinația la situs specific, în vederea includerii proceselor legate de Mu, Tn și SI, care, deși se inseră aparent la întîmplare, depind de un situs specific caracteristic.

Recombinația „nelegitimă”

Numită și aberantă (Kopecko, 1980) necondiționată de existența unui situs specific, includea în sensul original (Franklin, 1971) un spectru mai larg de fenomene. Are o frecvență foarte mică, se produce la situsuri aparent întîmplătoare, între regiuni ale ADN cu omologie foarte mică sau nulă. Este limitată la cazuri cu caracter absolut întîmplător sau cu foarte mică specificitate, ca duplicările și delețiile care nu implică intervenția Tn sau SI, precum și la cele ce însoțesc formarea anumitor factori F-prim și a exciziilor care determină producerea fagilor de transducție specializată. Murray și Murray (1974) au semnalat fuziuni de ADN neomolog care pot fi numite nelegitime. Probabilitatea ca astfel de recombinații să fie viabile sau activi este foarte mică. Natura pare să limiteze producerea lor la nivelul a mai multe ordine de mărime sub nivelul recombinației generale. Cu toate acestea, astfel de recombinații nelegitime sînt foarte importante în evoluție.

Recombinația genetică și evoluția

Analizînd comparativ rolul diferitelor căi de producere a diversității biologice, Cohen și Shapiro (1980) consideră că mutațiile produc modificări relativ limitate în structura mesajului genetic și sînt prea rare pentru ca aceasta să poată fi explicată numai prin mutațiile care apar în fiecare generație. Recombinația genetică ar putea avea — teoretic — un rol

important la bacterii, deoarece produce redistribuire importante ale caracterelor transmise de la o generație la alta, facilitând acumularea în același individ a unor mutații avantajoase, apărute separat în celule diferite (Rodmer, 1970). Avantajul lor evolutiv trebuie însă exprimat la nivel de populație și nu la nivel de individ. Transferul interbacterian de gene, urmat de recombinare genetică, ar asigura o regrupare într-o celulă a unui număr important de mutații, care s-au acumulat în populația respectivă, în cursul mai multor generații. Acest proces este însă limitat de constrîngerile recombinării omologe, care împiedică schimbul de informație genetică între organisme neînrudite, cărora le lipsește un grad important de similaritate a secvențelor în ADN. Se adaugă faptul că unele modalități de transfer genetic la bacterii sînt limitate numai la anumite specii și că anumite exigențe (de exemplu, prezența plasmidei de sex sau a competenței în cazul conjugării, respectiv al transformării) le restrîng acțiunea la un număr limitat de specii. Cu toate acestea, Lederberg și Edwards (1953) consideră că cele mai multe serotipuri existente în natură au luat naștere prin recombinare (mai concret, cele descrise la *Salmonella* au apărut consecutiv transducției). Deși este greu de exclus acțiunea directă a mutațiilor în geneza lor, faptul că multe serotipuri sînt permutări sau combinații ale altor serotipuri și că nici unul dintre ele nu a fost obținut în laborator prin mutație, pledează pentru originea lor prin recombinare. Datorită acestui fapt, recombinarea genetică omologă s-ar rezuma la schimbul unor segmente de ADN înrudite structural și ancestral, respectiv la schimbul dintre diferite alele ale aceleiași gene sau dintre gene diferite, care au însă secvențe nucleotidice similare. Viteza mică a evoluției realizată prin mutație și recombinare genetică explică atît gradul de diversitate prezent la mai multe specii, cît și persistența diferitelor specii distincte de bacterii, care rețin identitatea de bază de-a lungul generațiilor.

În ansamblu, se poate considera că recombinarea genetică și implicit reproducerea sexuală sînt mult mai frecvente la microorganismele eucariote decît transferul interbacterian de gene la procariote. Bodmer (1970), a arătat, pe bază de calcul matematic că în condiții de mediu egale, avantajul evolutiv al reproducerii sexuate este mult mai mare în populațiile mai mici. Or, mărimea populației diferitelor organisme scade pe măsură ce complexitatea acestora crește. Simplitatea organizării procariotelor determină, printre alți factori, populații foarte mari și, probabil, un avantaj evolutiv mult diminuat al recombinării. Cu toate acestea, existența recombinării genetice la procariote a avut se pare un rol esențial pentru evoluția ulterioară a sistemelor sexuale obligatorii ale organismelor superioare. După Cohen și Shapiro (1980), elementele genetice transpozabile, descrise succesiv la plante, la bacterii și la unele animale ar fi cele care, prin ceea ce s-a numit inițial recombinare „nelegitimă” ar putea determina la bacterii, legarea unor segmente de ADN cu mici relații ancestrale sau chiar fără, afectînd evoluția, fie în trepte mici, fie în salturi mari.

Stabilitatea și variabilitatea genetică a bacteriilor în natură*

În ultimul deceniu, au fost descifrate numeroase detalii ale mecanismelor care permit mobilizarea unor gene din ADN bacterian, transferul și reamplasarea lor în genomul celulelor aparținând aceleiași specii sau, uneori, a unor specii îndepărtate genetic. A fost stabilită mobilitatea lor excesivă, fapt care a dus, prin extrapolarea rezultatelor obținute în condiții controlate de laborator la mediile naturale, la concluzia — susținută de mulți cercetători — că unele gene procariote s-ar găsi într-o stare de flux continuu. În mod special s-a considerat că plasmidele ar forma un genom „colectiv”, capabil să determine o evoluție foarte rapidă, datorită proprietății lor de a fi ușor transmisibile de la o bacterie la alta. Marea flexibilitate genetică a bacteriilor s-ar realiza, în special, când sint confruntate cu condiții noi sau variabile de mediu, în așa fel încît identitatea taxonomică a speciilor lor ar putea fi compromisă, prin înglobarea de ADN eterolog. Într-o formă extremă, lumea bacteriilor este considerată ca formînd o rețea biologică de informații, o entitate bacteriană globală, unificată genetic și funcțional, ca un superorganism. Această unificare s-ar realiza prin schimburi interpenetrant de gene plasmidiale, care ar forma un depozit de informație global, ce menține colectivitatea bacteriană într-o stare optimă la nivel planetar (Sonea și Panisset, 1980, 1983).

În contrast cu aceste puncte de vedere, izolarea repetată din mediile naturale a unor biotipuri bacteriene virtual identice, deși proveneau din nișe ecologice specifice foarte diferite, sugerează existența unei anumite stabilități a constituenților esențiali ai genomului bacterian.

Transferul de material genetic în natură

Date experimentale demonstrează că mecanismele de transfer de material genetic identificate în condiții de laborator funcționează cu particularități specifice și în diferite medii naturale.

După Reanney și colab. (1983), *transferul de material genetic este favorizat de*: 1) densitățile mari de microorganisme în medii biologice active,

* Acest capitol a fost elaborat, în special, pe baza concepțiilor și a informațiilor primite de la prof. A. Campbell (S.U.A.), D. C. Reanney (Australia), P. C. Gowland și J. H. Slater (Marea Britanie), cărora le mulțumesc în mod deosebit. El reprezintă o încercare de conciliere a punctelor de vedere contradictorii exprimate de specialiști în domeniul plasmidelor, mutațiilor, elementelor genetice transpozabile și al mecanismelor de transfer de material genetic (prezentate în capitolele respective), asupra semnificației acestora în variabilitatea și evoluția bacteriilor.

ca rizosfera diferitelor suprafețe și interfețe, la nivelul cărora biomasa tinde să se concentreze în natură; 2) eliberarea masivă de ADN din biomasa moartă sau muribundă; 3) prelungirea timpului de înjumătățire a ADN extracelular în solurile cu conținut ridicat de coloizi (după Duboise și colab. (1974), ADN adsorbit pe argile minerale este protejat, fie prin realizarea unor configurații moleculare mai condensate, fie printr-o serie de restricții spațiale, care întârzie sau împiedică reacțiile de inactivare); 4) spectrul larg de gazde și stabilitatea plasmidelor; 5) replicabilitatea rapidă a unităților de ADN „egoist” și tendința lor de a se răspândi în proporții epidemice.

Transferul de gene este inhibat sau împiedicat de: 1) separarea spațială și temporală a bacteriilor, în cele mai multe medii naturale; 2) imobilizarea fagilor și a bacteriilor pe particulele de sol; 3) prezența mucilațiilor, lectinelor și a altor substanțe care fixează celulele; 4) prezența unor bariere genetice de tipul sistemelor de restricție, a imunității față de fagul omolog sau a unor interacțiuni foarte specifice între aparatul de transfer codificat de elementele genetice accesorii (pili, placa bazală a cozilor fagice etc.), care, funcționând la suprafața celulelor, restring șansele de recunoaștere și înglobare numai la ADN omolog sau evasiomolog. Dacă aceste bariere sunt depășite, în unele cazuri, mai pot interveni fenomenele de incompatibilitate între plasmide.

Interacțiunea dintre acești factori este modulată de o serie de condiții foarte variabile, care fac ca ceea ce este adevărat pentru o nișă ecologică sau pentru un grup de microorganisme să fie fals pentru altul (Reanney și colab., 1983). Potențialul optim de transfer de gene se realizează în natură în special atunci când microorganismele se confruntă cu prezența unor compuși naturali neobișnuiți (în absența celor uzuali), sau cu compuși xenobiotici. În ambele cazuri, bacteriile au nevoie de anumite căi catabolice fie pentru utilizarea compușilor respectivi, ca sursă majoră de C și energie, în primul caz, fie pentru a-i neutraliza, suprimându-le efectul toxic și/sau letal, în al doilea. În concepția clasică, dobândirea acestor căi noi sau modificate este considerată ca o consecință a unui proces lent, de acumulare a unor mutații punctiforme, care duc treptat la apariția lor. Or, numeroase exemple demonstrează, pe de o parte, că în condițiile mediului actual, microorganismele sînt cel mai adesea confruntate brusc cu aceste condiții noi, uzual nocive, și, pe de altă, că gama diversității lor este foarte largă. Reanney și colab. (1983) citează datele lui Munnecke (1981), care arată că numai într-o regiune din vestul Marii Britanii au fost utilizate — pentru atingerea concentrațiilor active în sol, 2 miliarde de kg de pesticide de uz agricol, de 500 de tipuri, în peste 5 000 de formule diferite. Cum ideea unei modificări prin re-evoluție într-un timp atât de scurt a microorganismelor confruntate cu astfel de situații este improbabilă, Slater și Sommerville (1979) consideră că noile proprietăți sînt mai degrabă consecința reasortării unor gene din populațiile mixte, care formează habitatul natural respectiv. Clarke (1974) însă, nu exclude în aceste condiții și participarea unor sisteme enzimactice bacteriene (implicate în metabolismul unor substraturi normale), care ar putea cataliza și o serie de reacții neobișnuite, din cauza lipsei unei specificități absolute de substrat.

Prezența ADN în mediile naturale

Cantitatea de ADN prezentă în mediile naturale, de exemplu în sol, este greu de apreciat, deoarece microorganismele sînt concentrate în nișe specifice, în care densitatea lor depășește cu mult densitatea medie în sol și, în plus, este expusă unor variații mari, determinate de natura lor, de tipul de sol, temperatură, pH, ca și de interrelațiile favorizante sau inhibitoare.

Bacteriile individuale conțin o cantitate foarte mică de ADN (0,0048 pg la *Bacillus subtilis*), comparativ cu alte celule (4–8 pg în nucleul celulelor animale, respectiv 38,7 pg în celulele meristematice diploide din rădăcina apicală la *Vicia faba*). Aceste cantități mici sînt compensate de numărul mare de celule, care formează populații imense în anumite nișe ecologice. Cantitatea de ADN per gram de sol uscat este estimată la 50–207 μ g, iar cea existentă într-un hectar, la 147 g.

Rolul solului este apreciat în mod contradictoriu. Pentru unii cercetători, ar putea conferi protecție față de degradare, datorită adsorbției pe colozii din argile, care ar impune anumite constrîngerii spațiale sau configurații mai condensate ce întîrzie sau împiedică reacțiile de inactivare (Dubois și colab., 1979). Cantitatea de ADN din sol este mult mărită în zonele în care se găsesc celule moarte recent sau muribunde, din care acesta este eliberat prin liza celulei sau permeabilizarea învelișurilor celulare.

Savage (1977) apreciază că organismul uman (alcătuit din $\sim 10^{13}$ celule) ar conține ~ 8 g ADN chimic pur, la care se adaugă $\sim 0,025$ g provenit din cele $\sim 10^{14}$ microorganisme, care îl populează.

Transformarea genetică în natură

Demonstrarea faptului că unele specii bacteriene eliberează ADN, în anumite faze specifice ale ciclului de viață, precum și capacitatea acestuia de a persista în sol, în stare extracelulară, sugerează existența unei cuplări între procesele de eliberare și înglobare a ADN, cu implicații în evoluție. Este probabil că această cuplare ar fi favorizată cînd bacteriile încep să facă față unor probleme de supraviețuire. Transformarea genetică este un proces mai frecvent în solurile bogate în microorganisme, făcînd ca biomasa „moartă” să contribuie semnificativ la modificarea genetică a generațiilor ulterioare. În acest proces, cantitățile foarte mari de ADN eliberat în sol contrabalansează șansele reduse ale unui fragment liber de ADN de a coloniza și transforma o celulă bacteriană.

Există și posibilitatea unui schimb de ADN între bacterii și plante, sugerat de faptul că acoperirea segmentelor radiculare de mîșoane bacteriene variază cu vîrstă rădăcinilor și este maximă la nivelul țesuturilor muribunde, cînd probabil se eliberează și ADN genomic.

Există și posibilitatea unui transfer plantă \rightarrow bacterie, sugerat de Roberts (1982), după care plasmida Ti de la *Agrobacterium tumefaciens* ar proveni din celulele vegetale moarte sau muribunde, de la care a fost preluată de către microorganismele ce populează regiunea radiculară.

Conjugarea bacteriană în natură

Conjugarea este un proces de transfer de material genetic favorizat în raport cu transformarea și transducția genetică. Transformarea necesită

omologie extensivă între ADN exogen și cel rezident și, ca urmare, este mai eficientă când donatorul și receptorul sînt genetic identici sau măcar similari. Fagii temperați au un spectru de gazde limitat la unele grupe taxonomice specifice și necesită, de asemenea, regiuni preexistente de omologie pentru a se integra în ADN receptor. Plasmidele conjugative conferă bacteriilor o serie de avantaje ce favorizează transferul de informație genetică :

1) Au un spectru de gazde (cel puțin cele din anumite grupuri de incompatibilitate, ca N, W, P, Q, C etc.) care le permite să invadeze specii foarte diferite.

2) Nu sînt distruse de sistemele de restricție, deoarece se replică atît de rapid încît dobîndesc marcajul protector prin metilare, înainte ca toate copile lor să fie degradate.

3) „Supraviețuirea” lor pe termen lung este mult mai sigură decît aceea a unei bacterii individuale din spectrul larg al gazdelor posibile (vezi pag. 106).

4) Pot face obiectul unor procese naturale de ingineria genelor, prin care ADN neomolog, clivat de restricțaze *in vivo*, poate fi sudat în noi combinații genetice (Reanney, 1976, 1983).

5) Deși integrarea lor cromosomală este în general reversibilă, în unele cazuri, reversia la starea autonomă se face cu desprinderea unor markeri cromosomalii, care devin constituenți stabili ai plasmidei (Holloway, 1979); în felul acesta, genele cromosomale devin capabile să fie transferate la spectrul de gazde ale plasmidei purtătoare. După Reanney (1977), prin acest mecanism, orice genă procariotă poate difuza într-un ecosistem la foarte multe dintre gazdele întîlnite;

6) Plasmidele conjugative le pot mobiliza și pe cele neconjugative, mai mici și mai numeroase, pe cel puțin două căi : a) printr-un proces de recombinare, în care repliconul mai mic formează cu plasmida conjugativă o structură cointegrată, ce poate trece, în bloc, de la o celulă la alta ; b) favorizînd prin conjugare transferul plasmidelor neconjugative coexistente, ca atare, fără recombinare.

Cu toate aceste particularități favorizante, eficiența conjugării în condiții ecologice naturale este foarte deosebită de cea observată în laborator, fiind influențată de un număr mare de factori interconectați. Între factorii care diminuează frecvența conjugărilor în natură pot fi citați :

1) Factorii fizici : a) prezența unor mucigeluri sau a unor structuri fibrilare, care capturează bacteriile și le imobilizează ; b) existența unor curenți de apă, care pot rupe pilii sau cozile fagilor ; c) variațiile de temperatură (cele mai multe plasmide se transmit la 25–38°C ; Yoshika și Nakatani, 1976).

2) Factorii biologici : a) numărul foarte mare (~70–85%) al bacteriilor în stare latentă ; b) diviziunea lor lentă (o dată pe zi, pînă la de cîteva ori pe an), care limitează numărul celulelor expuse transferului conjugal.

3) Intervenția unor factori ca, incompatibilitatea, excluderea de suprafață etc., care limitează transferul, protejînd celulele de pătrunderea de ADN străin.

4) Un factor limitant, mai puțin așteptat, este reprezentat de faptul că, în unele cazuri, prezența plasmidelor prezintă un dezavantaj pentru celule, în special când funcțiile pe care le codifică nu sînt necesare. Astfel, introducerea plasmidei R 68—H 5 la *Pseudomonas putida* reduce viteza de creștere a populației acesteia cu 30%. Efectul este mai pronunțat în special în mediile sărace în nutrienți. S-a demonstrat, de asemenea, că în culturi continue celulele fără plasmide au avantaje competitive față de cele cu plasmide, ceea ce sugerează că sinteza de ADN redundant nu numai că nu favorizează celulele, dar chiar le este dăunătoare.

Transducția genetică în natură

Numeroase date demonstrează că în natură cele mai multe genomuri fagice există în stare de profag. Unele specii bacteriene, ca *Pseudomonas aeruginosa*, sînt lizogene în 100 % din cazuri, iar altele, polilizogene, putînd purta mai mulți profagi (8 profagi în cazul unor tulpini de *Pseudomonas*, studiate de Holloway și Krishna Pillai, 1975). Numărul fagilor prezenți extracelular în sol este foarte variabil și greu de cuantificat, dar este apreciat, în general, ca foarte mare.

După Reanney și colab. (1983), capacitatea ADN fagic de a alterna între o stare intracelulară și alta extracelulară ar face parte dintr-o strategie de „supraviețuire”, atît în condițiile în care bacteriile-gazdă mor sub influența unor perioade lipsite de nutrienți, în prezența frigului, a substanțelor citocide sau a antibioticelor, cît și pentru perioade mult mai îndelungate de timp. Datorită acestui fapt, transducția ar fi putut apărea, în natură, ca o modalitate de păstrare a genelor fagice și a unor gene bacteriene față de efectele adverse ale variațiilor de mediu. Această funcție este evidentă în special:

1) În cazul fagilor capabili de transducție generalizată, ce înglobează fără nici o discriminare gene bacteriene. Aceștia, prin capacitatea lor de a încapsida la întîmplare gene bacteriene, ilustrează o parte dintr-o strategie mai amplă, care permite tuturor genelor procariote să depășească anumite condiții nefiziologice din mediu.

2) În cazul unor fagi care au capacitatea de a infecta specii sau chiar genuri diferite (spre exemplu, fagul P1 care infectează în natură bacterii din 9 genuri uneori foarte diferite (*Myxobacteria* și *Agrobacterium*, după Murooka și Harada, 1979).

Toate aceste date pledează pentru o „conviețuire” strînsă între fagi și bacterii de-a lungul evoluției, reflectată și în anumite particularități de structură moleculară a ADN, cum ar fi raportul G + C, foarte asemănător pentru cuplul fag—bacterie, în fiecare taxon studiat. ADN cromosomal de la genul *Bacillus* conține 32—56 % G + C, iar genomul fagilor respectivi 31—60 %. Aceasta sugerează, după Reanney și Ackermann (1982), că selecția a tratat ADN fagic ca pe un constituent normal al bacteriilor respective.

În ceea ce privește semnificația transducției genetice ca mecanism de transfer de material genetic în natură, se consideră că ea ar fi probabil, mai eficientă în cazul populațiilor bacteriene mari și foarte concentrate spațial. În medii cu populații rare și dispersate — așa cum este solul în stare de repaus — potențialul de transfer este foarte mic.

Factorii determinanți ai stabilității genetice a bacteriilor în natură

Unul din aspectele paradoxale ale evoluției bacteriilor decurge din faptul că, deși numeroase probe de laborator incontestabile demonstrează ușurința cu care bacteriile pot schimba informația genetică prin diferite mecanisme, în cadrul speciei sau chiar între specii diferite, observații categorice arată că ele și-au păstrat identitatea taxonomică și fenotipică de-a lungul unor intervale mari de timp. Acest lucru este cu atât mai evident în cazul unor bacterii bine cunoscute, cum este, spre exemplu, *E. coli*, care în forma sa actuală nu diferă prin nici o proprietate esențială de *Bacterium coli commune*, descoperit de Escherich în anul 1885. Deși a întâlnit numeroase oportunități de rearanjare a informației genetice sau de incorporare de material genetic eterolog, ea își păstrează nealterată identitatea în liniile sale esențiale. Această stabilitate are la bază o serie de factori importanți, între care cităm:

1) Faptul că în natură cea mai mare parte din ADN bacterian este în stare de repaus, nereplicabil, reprezintă unul dintre factorii majori ai stabilității. Creșterea și multiplicarea bacteriilor în natură sînt mult mai lente, numărul de generații/an este infinit mai mic decît în culturile de laborator și, în consecință, procesele de transfer și schimburi de gene, care sînt condiționate de replicare și de recombinare, sînt foarte rare sau chiar sporadice.

2) În timp ce potențialul mecanismelor de transfer de a produce modificări genetice este incontestabil, gradul în care el se realizează în natură nu trebuie supraestimat. Numeroasele bariere care recunosc ADN străin asigură, probabil, ca ADN extracelular să treacă în special în celule cu secvențe genomice omologe sau măcar înrudite. Chiar conjugarea pare să fi evoluat în așa fel încît genele cromosomale esențiale sînt rar perturbate, în timp ce genele extracromosomale accesorii „se duc și se întorc” liber (Campbell, 1981). Ca o consecință, genomurile bacteriene rămîn stabile pentru că procesele de transfer, care teoretic le dotează cu o extraordinară flexibilitate adaptativă, nu afectează în mod normal genele care le conferă identitatea și par să acționeze, cel puțin în parte, pentru a apăra genele preevolute de riscurile mediului variabil (Reaney și colab., 1983).

3) Strategia majoră care conciliază variabilitatea și stabilitatea bacteriilor este, după Reaney și colab. (1983), în principal, diviziunea informației genetice între cromosom (ce apare ca un depozitar „fixat” de gene esențiale) și informația genetică extracromosomală (în toate formele sale), care formează o „bibliotecă plutitoare” de gene („floating library”). Datorită acestei diviziuni, în natură ar exista un spectru continuu de mobilitate a genelor, în care informația cromosomală s-ar găsi la extremitatea caracterizată printr-o stabilitate maximă. Transferul genelor cromosomale într-un alt situs pe cromosomul aceleiași specii sau în celulele altor specii este rar avantajos din punctul de vedere al selecției. De aceea, cromosomii bacterieni păstrează ordinea generală a genelor și specia își menține identitatea de-a lungul unor intervale lungi de timp, deși apar multe posibilități de rearanjare a lor sau de incorporare a unor gene eterologe.

Lucrurile se petrec ca și cum ar exista o forță conservatoare, care acționează pentru a stabiliza configurația genetică a genomului bacterian, în fața forțelor ce acționează pentru a o modifica (Riley și Anilionis, 1978). Acest comportament ar fi, după Campbell (1982), consecința faptului că genomurile eucromosomale ar fi complexe integrate, perfect coadaptate, ceea ce ar face ca intereschimbul părților lor să fie, în general, nociv. În schimb, genele accesorii ar fi transferate între diferitele tulpini sau specii de bacterii-gazdă și ar fi selecționate pentru a funcționa cu succes în toate aceste celule-gazdă. Existența unor mecanisme pentru transferul genelor eucromosomale în ADN accesoriu și înapoi ar putea fi un argument pentru ideea că o genă este găsită într-o anumită localizare (pe cromosom sau pe o plasmidă) pentru că selecția naturală a furnizat această localizare. Dar, cu toate acestea, după cum observă Campbell (1981), selecția naturală pe termen îndelungat a avut tendința de a fixa genele eucromosomale ca „specialiști”, iar pe cele accesorii ca „generalisti”. În felul acesta, considerarea celor dintii ca rezidenți stabili și a genelor accesorii ca „vagabonzi permanenți” este mai degrabă naturală, decît arbitrară.

Concluzia generală a acestor fapte este că modelele privind evoluția unor procese de transfer de material genetic la bacterii realizate *in vitro*, în condiții de laborator, nu pot fi extrapolate pentru realitățile din natură și, ca atare, nu permit concluzii cu caracter de generalitate. Un argument foarte concludent în acest sens este și faptul că timpul mediu de generație al unei bacterii în natură poate fi de citeva sute de ori mai mare decît în condiții de laborator (Brock, Gray și Williams, 1971).

Colonizarea genetică

(Pl. 31)

Transferul de gene ca proces infecțios

Cu excepția unor fenomene de transfer interspecific și intergenerice de material genetic întâlnite la bacterii, în condiții naturale, schimbul de material genetic între organisme aparținând unor specii diferite este supus unor limitări severe. Diferitele tipuri de mecanisme sexuale asigură schimbul de material genetic numai între organisme strins înrudite, o întreagă gamă de bariere și mecanisme naturale împiedicând schimburile între organisme mai mult sau mai puțin neînrudite.

Cancerul bacterian al plantelor. Tumorile „Crown gall”. Unele relații parazitare sau simbiotice furnizează exemple în care forța evoluției poate învinge aceste bariere, dacă relația respectivă crează un avantaj selectiv pentru parazit. Formarea tumorii *Crown gall* este un exemplu natural, care ilustrează această situație (Schell și Van Montagu, 1979, 1983).

Sub denumirea de *Crown gall* (engl. „crown” = coroană; „gall” = L. galla = excrescență, tumoră pe plante) a fost descrisă o boală neoplazică, foarte răspândită în natură, manifestată prin apariția de tumori caracteristice la nivelul coletului, acoperite de excrescențe ± diforme, de tipul teratoamelor. Ea afectează peste 142 de genuri de plante dicotiledonate, aparținând la 61 de familii diferite. Originea bacteriană a bolii a fost demonstrată de Smith și Townsend (1907), care au identificat agentul patogen, bacteria din sol, *Agrobacterium tumefaciens*. Brown și White (1943) au arătat că tumorile conțin celule transformate stabil, modificate genetic, care proliferază activ și sint transplantabile la alte plante sănătoase.

Mecanismul infecției. Experimental s-a demonstrat că infecția cu *A. tumefaciens* este condiționată de o rănire obligatorie a plantei-gazdă, însoțită de o reacție tisulară și de instalarea „competenței” (capacitatea de a suferi transformarea) celulelor în contact cu rana. Competența apare după 24 de ore de la rănire și durează 72 de ore. Rănirea „descoperă” situsurile de legare de pe suprafața celulei vegetale, care interacționează cu lipopolizaharidele membranei externe a bacteriilor (Drummond, 1979). Transformarea apare în câteva zile de la infecție, după care prezența celulelor bacteriene nu mai este necesară pentru proliferarea țesutului tumoral. De aceea, frecvent, la floarea soarelui pot apărea tumori secundare (metastaze) lipsite de bacterii, la distanță foarte mare de tumora primară. Țesutul vegetal transformat este recunoscut prin capacitatea sa de a forma excrescențe cind este transplantat la plante sănătoase sensibile, de a putea

fi cultivat, practic indefinit, pe medii chimice, lipsite de hormoni vegetali absolut necesari, în mod normal, pentru creșterea celulelor vegetale în culturi (Braun, 1958, 1972) și de a sintetiza o serie de derivați neobișnuiți ai aminoacizilor bazei — *opinele* — absenți în țesutul vegetal normal (Drummond, 1979).

Deoarece caracterul tumoral al celulelor poate fi menținut *in vitro* practic indefinit (ca și în cazul celulelor animale transformate malign), chiar în absența bacteriilor, inițial s-a ajuns la concluzia că *A. tumefaciens* ar produce un principiu inductor „tip” (Tumor inducing principle), răspunzător de apariția tumorii și probabil de menținerea ei.

Natura chimică și semnificația opinelor. Studiind biochimia celulelor tumorale, Petit și colab. (1970) au evidențiat prezența unor derivați ai aminoacizilor bazei, descriși sub denumirea de *opine*. Acestea se formează prin condensarea reductivă — catalizată de NADPH — a grupării ceto- a unui cetoacid, cu gruparea α -amino a unor aminoacizi bazei. Au fost identificate două categorii de opine: 1) *octopinele* reprezentate de *lizopină*, *octopină*, *acidul octopinic* și *histopină*, formate de la acid piruvic (cetoacid) și aminoacizii bazei, lizina, arginina, ornitina respectiv histidina; 2) *nopalinele*, numite astfel de Morel (1972), după denumirea franceză (*nopal*) a plantei din care au fost izolate (*Opuntia*), sint reprezentate de *nopalină* și *ornalină* sau *acidul nopalinic*. Ele se formează de la acidul α -cetoglutaric și de la acizii bazei arginina respectiv ornitina.

Coxon și colab. (1980) au izolat un nou compus din seria octopinelor, *agropina*, derivat heterociclic neobișnuit al hexitolului. Cu excepția nopalinelor, a căror prezență a fost semnalată la unele moluște, opinele nu sint întâlnite la alte organisme (Van Montagu și colab., 1980).

Analizând proprietățile metabolice ale tulpinilor de *A. tumefaciens*, Petit (1970) a demonstrat că și acestea pot fi grupate în două categorii distincte și anume: 1) unele tulpini induc sinteza octopinelor în celulele de „Crown gall” și le pot utiliza selectiv ca sursă de C, N și energie, fără vreă influență asupra biosintezei și catabolismului nopalinelor; 2) alte tulpini induc biosinteza nopalinelor și le pot utiliza selectiv ca surse de C, N și energie, fără vreun rol în metabolismul octopinelor. Aceste date sugerează, pe de o parte, existența unei legături genetice între oncogenitate și metabolismul opinelor și, pe de alta, posibilitatea unui transfer de informație genetică de la bacterii la plante, răspunzător atât de oncogeneză*, cit și de modificările corelate ale metabolismului opinelor (Lippincott, 1973; Kerr, 1976). Ulterior, Zaenen și colab. (1974), precum și Schell și colab. (1975) au descoperit că atât formarea tumorilor „Crown gall” cit și metabolismul opinelor sint legate de prezența unei plasmide mari numită Ti (Tumor inducing) la toate tulpinile virulente ale bacteriei *A. tumefaciens*.

Conceptul de colonizare genetică a fost elaborat de Schell și Montagu (1979) reünind toate aceste date într-un concept general (fig. 253). În conformitate cu aceste date *Agrobacterium* și, probabil, alte bacterii au dezvoltat, în cursul evoluției lor, un mecanism complicat prin care își pot

* Termenul este folosit în acest context în sens larg, pentru a defini capacitatea unei tulpini de *A. tumefaciens* de a induce apariția de tumori la plantele normale sensibile.

transfera o parte din propria lor informație genetică la plante, în așa fel încât celulele vegetale transformate exprimă o serie de caractere fenotipice noi (de exemplu, proliferarea necontrolată, sinteza și probabil eliberarea de opine). Bacteriile beneficiază de această transformare, deoarece

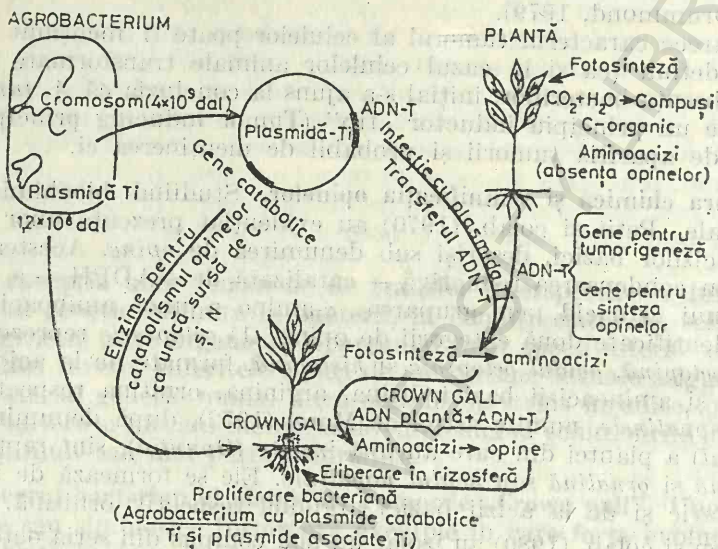


Fig. 253. — Conceptul de „colonizare genetică”. Reprezentare schematică după Schell și Van Montagu (1979).

pot utiliza selectiv opinele pentru creștere și multiplicare, dobîndind astfel un important avantaj selectiv față de celelalte microorganisme din sol. În felul acesta, apare un tip nebănuit de parazitism, în care parazitul introduce o parte din informația sa genetică în genomul gazdei, forțînd-o să sintetizeze produși (opine) pe care îi poate utiliza numai el. Bacteria utilizează o parte din substanțele rezultate din activitatea fotosintetică a gazdei, creîndu-și un avantaj selectiv asupra altor organisme cu care este în competiție, și care nu pot folosi opinele.

Rolul plasmidelor Ti. Zaenen și Schell (1974) au demonstrat pe mai multe căi că formarea tumorii „Crown gall” este determinată genetic de prezența plasmidei Ti: 1) plasmidele Ti sînt prezente la toate tulpinile de *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, virulente, testate; 2) pierderea plasmidei Ti dintr-o bacterie oncogenă o face neoncogenă; 3) introducerea plasmidei Ti prin conjugare sau transformare într-o bacterie neoncogenă o face oncogenă (Van Larebecke, 1975; B. Watson și colab., 1975).

Au fost descrise trei tipuri de plasmide Ti, cu origine evolutivă diferită, deoarece se deosebesc marcat în secvențele de ADN și în spectrul de gazde: 1) plasmidele „Ti octopină”, care poartă determinanți genetici pentru metabolismul octopinei; 2) plasmidele „Ti nopalină”, care codifică informația necesară pentru metabolismul nopalinei și al ornalinei și 3) plasmidele „Ti criptopină”, pentru o opină încă neidentificată (Van Montagu, 1979).

Structura genetică și funcțională a plasmidelor Ti. Plasmida Ti este o plasmidă mare, cu o masă moleculară variind între 90 și 182×10^6 dal. Nu se cunoaște numărul total de gene din structura sa și nici cel al genelor care determină un anumit fenotip. Au fost studiate, în special, două plasmide: *pTiAch5 octopină* și *pTiC58 nopalină*, la care s-a încercat localizarea diferitelor funcții, cu ajutorul mutagenzei induse prin inserție de transpozoni. În acest fel, au fost identificate mai multe categorii de determinanți genetici. După Joos și colab. (1984), în cazul plasmidei *Ti nop*, două regiuni separate determină formarea tumorilor: regiunea ADN-T și regiunea ADN-vir (fig. 254).

Fig. 254. — Reprezentarea schematică a unei plasmide *Ti-nopalină*, cu localizarea relativă a regiunilor T și de virulență (după Joos și colab. 1984).



Regiunea ADN-T (ADN transferat) conține toate secvențele nucleotidice ale plasmidei Ti, prezente în cele mai multe linii de celule tumorale. Are o structură complexă, fiind alcătuită, probabil, din două segmente funcțional și evolutiv diferite: unul, comun tuturor plasmidelor Ti, implicat direct în oncogenitate (alcătuit din 2–3 gene), și altul, care a evoluat independent, specificând sinteza diferitelor opine și care s-a legat covalent, ulterior, de cel dintâi.

Regiunea ADN vir sau de virulență conține gene esențiale pentru formarea tumorilor (fig. 254), dar spre deosebire de ADN-T nu este regăsită în acestea. Are o structură complexă și un rol esențial în inducerea tumorigenezei, dar nu și în menținerea ei (Caplan și colab., 1983). Genele pentru transfer, care conferă plasmidei funcția *tra* (de conjugon), sint asociate cu metabolismul opinelor, fiind inductibile în prezența opinei omologe. Mecanismul are semnificație teleonomică: opinele induc specific transferul prin conjugare al plasmidei Ti, asigurând răspindirea ei rapidă, într-o populație mixtă de bacterii oncogene și neoncogene (Drummond, 1979; Schell și colab., 1980).

Funcția catabolică a plasmidelor Ti. Metabolismul opinelor este o caracteristică esențială a bolii „Crown gall”. Țesutul tumoral axenic sintetizează opine, care servesc ca sursă de C, N și energie bacteriilor oncogene. Natura opinei sintetizate este determinată nu de planta-gazdă ci de bacterie și este invariabil tipul de opină catabolizată de tulpina inductoare (Morel, 1968, 1970). Plasmida Ti codifică atât sinteza, cât și degradarea fie a octopinei, fie a nopalinei (niciodată ambele). Dintre produșii genelor respective, sintetazele sint folosite de plante; iar oxidazele de *A. tumefaciens*. Genele care controlează sinteza nopalinei (*Nos*) în celulele

vegetale transformate și genele care permit catabolizarea acestora (*Nos*) sînt funcțional diferite și localizate pe segmente diferite, dar adiacente în plasmida Ti (fig. 255).

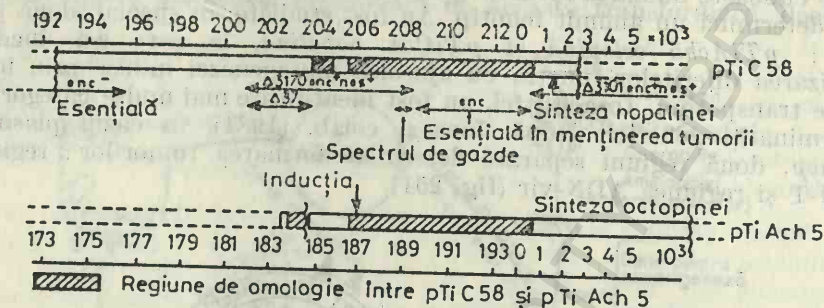


Fig. 255. — Organizarea funcțională a ADN-T din plasmida *pTiC58*-nopalina și plasmida *pTiAch5*-octopina. Regiunile de omologie sînt evidențiate prin hașuri. Coordonatele sînt date în Kb. Săgețile inferioare arată extinderea unor mutații prin deleție și anumite proprietăți, ca tumorigeneza (*Onc*) și capacitatea de a sintetiza nopalina (*Nos*) (după Van Montagu, 1980).

Plasmidele Ri. În mod asemănător, *A. rhizogenes* induce la multe plante dicotiledonate o boală care constă într-o proliferare radiculară anormală („Hairy root”). Tulpinile virulente ale acestei bacterii conțin o plasmidă mare, Ri („Root inciting”), avînd 230 Kb, pe care sînt localizate genele ce induc rizogeneza. Ea conține un segment de ADN comparabil regiunii T a plasmidei Ti, care se integrează în cromosomul celei-gazdă.

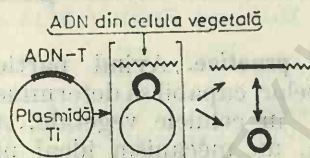
Plasmidele Ti și Ri au o oarecare omologie în regiunile de ADN implicate în determinarea virulenței tulpinilor, ale căror gene par să fi fost conservate în cursul evoluției celor două bacterii (Ream și Gordon, 1982).

Mecanismul molecular al tumorigenezei nu se cunoaște exact. Teoretic, există trei posibilități reprezentate de interacțiunea directă a ADN-T cu genomul plantei-gazdă, de circularizarea ADN-T înainte de integrarea stabilă (Zambryski și colab., 1980) sau de formarea unui replicon independent ADN-T în nucleul celulelor vegetale (Van Montagu, 1980) (fig. 256). Interacțiunea dintre *A. tumefaciens* din plantă pune în mișcare un lanț de evenimente care, final, duc la transferul segmentului ADN-T din structura plasmidei Ti în genomul celei vegetale. În tumorile de tip nopalina, acest segment, lung de ~23 000 baze (~15,6 Mdal), a fost găsit ca fiind localizat în nucleu. ADN-T, care reprezintă după Chilton (1978) ~3% din molecula plasmidei, ar consta din cel puțin trei unități funcționale dintre care una centrală, avînd ~5,0 Mdal, prezentă în toate tipurile de plasmide Ti, este esențială pentru producerea tumorilor. Mutațiile la nivelul ei determină pierderea capacității de tumorigeneză (Schell și colab., 1983).

Fenomenul de reversie. Tumorile produse de *A. tumefaciens* de tip nopalina la tutun prezintă adesea primordii de tulpină care pot fi transplantate pe plante sănătoase sau pot fi cultivate *in vitro*. Plantele rezultate au morfologie normală, dar sintetizează nopaline, care pot fi găsite în frunze și în petale și conțin întregul segment de ADN-T. Tesuturile lor

trecute în subculturi *in vitro* se dezvoltă cu caracter tumoral. Plantele respective se dezvoltă normal, înfloresc, produc semințe fertile, dar plantele rezultate din aceste semințe sint complet vindecate (nu mai conțin ADN-T, au pierdut capacitatea de sinteză a opinelor și au nevoie de fitohormoni în culturi de celule). Vindecarea s-a produs printr-un mecanism

Fig. 256. — Reprezentarea schematică a diferitelor posibilități de transfer ale ADN-T de la plasmida Ti la ADN din celula vegetală (după Zambryski și colab., 1980).



încă necunoscut, probabil în cursul meiozei. După Zambryski și colab. (1980), este probabil că genomul vegetal are anumite situsuri preferențiale pentru legarea ADN străin, la nivelul unor secvențe repetitive de ADN. O proprietate a acestor situsuri de inserție ar fi aceea de a fi eliminate în cursul meiozei.

Plantele regenerare de la polen (prin androgeneză) sint, de asemenea, total vindecate, pierzind ADN-T, probabil în cursul diviziunilor celulare, care au dus la formarea grăuncioarelor de polen (Drummond, 1979).

Semnificația biologică a colonizării genetice. Colonizarea genetică reprezintă un tip aparte de parazitism în natură. Plasmidele Ti au evoluat ca un mecanism natural de inginerie a genelor, care permite bacteriei *A. tumefaciens* să „colonizeze” celulele vegetale, prin transferul informației genetice specifice purtată de segmentul lor ADN-T. În felul acesta, bacteria „forțează” celulele vegetative proliferante să sintetizeze opine, pe care le poate folosi ca sursă de C, N și energie numai bacteria ce poartă plasmida Ti omologă. Prin prezența lor, opinele conferă specificitate nișei ecologice reprezentate de țesutul tumoral, pe care o poate exploata numai bacteria oncogenă respectivă. Drummond (1979) consideră strategia opinelor față de plasmidele Ti ca un exemplu de „altruism la nivel molecular”, deoarece exprimarea ADN-T în celulele vegetale și sinteza opinelor măresc șansele de „supraviețuire” ale ADN-T, care face parte din genomul bacterian.

Fenomenul nu rămâne limitat la planta purtătoare de „Crown gall”, deoarece unele observații pledează în sensul unei eliberări de compuși celulari din tumoră, chiar în rizosferă. Van Montagu și colab. (1980) citează în acest sens prezența în rizosfera plantelor cu tumori de colet a unor tulpini de *Pseudomonas* capabile să utilizeze opinele.

Pe plan biologic general, colonizarea genetică reprezintă expresia unui fenomen larg răspândit: bacteriile cuceresc adesea o nișă ecologică nouă, prin dobîndirea capacității de a cataboliza o clasă unică de compuși organici, prezenți în cantitate mare într-un anumit teritoriu și nedegradabili de alte specii. Analizînd localizarea genelor care furnizează această capacitate degradativă, Chakrabarty (1976) a arătat că ele fac parte, cel mai adesea, din structura unor plasmide numite *catabolice* sau *degradative*. Plasmidele Ti sint însă de un tip special. În loc să „ajute” *A. tumefaciens* să degradeze compuși naturali din sol, forțează plantele dicotiledonate să sintetizeze cataboliți speciali — *opine* — pe care bacteriile le

folosească ca sursă de C, N și energie, inducând și formarea de tumori. Ele realizează astfel, o transformare genetică (metabolismul opinelor) și o transformare oncogenă. Colonizarea genetică demonstrează capacitatea bacteriilor de a-și dezvolta în cursul evoluției o structură genetică sofisticată — cum este plasmida Ti — adaptată pentru a face un transfer de gene, care modifică stabil celulele gazdei, îmbunătățind asociația în avantajul lor.

Aplicații practice. Având particularitățile unui sistem natural de inginerie a genelor, capabil să determine transferul, integrarea și exprimarea ADN „străin” în celulele vegetale, *A. tumefaciens* și plasmida Ti furnizează teoretic, un mecanism ideal pentru transferul genelor la plantele dicotiledonate. Această posibilitate a fost demonstrată de Schell (1980), prin integrarea în regiunea ADN-T a plasmidei Ti a unui transpozon (Tn7), ce conferă rezistență la streptomycină și trimetoprim, care a fost găsit, după infecție, în nucleul celulelor tumorale de la tutun. Transformarea mediată de plasmida Ti rezolvă — printr-un mecanism necunoscut — una din marile probleme ale ingineriei genelor, funcționarea informației genetice de tip procariot, într-o celulă eucariotă. Plantele monocotiledonate, care includ cele mai multe cereale, sunt rezistente față de colonizarea genetică printr-un mecanism încă ignorat (rezistență la infecție, cu *A. tumefaciens*, imposibilitate de transfer de ADN sau incapacitate de a răspunde tumorigen). Tehnica este aplicabilă numai plantelor cu înmulțire vegetativă, deoarece în cursul multiplicării sexuate ADN-T este pierdut și odată cu el, probabil, și genele utile transferate.

...transgenoză bacteriană... transferul de material genetic...

...transgenoză bacteriană... transferul de material genetic...

...transgenoză bacteriană... transferul de material genetic...

Doi și colab. (1973) au introdus termenul de transgenoză pentru a caracteriza transferul artificial, menținerea și exprimarea informației genetice bacteriene în celulele eucariote, prin intermediul fagilor transductori. Termenul, ales inițial pentru a evita presupunerea prematură a integrării genelor bacteriene în cromosomul celulei eucariote, ca în transducția fagică, este recomandat, în general, pentru a caracteriza cazurile în care celulele-donatoare și receptoare sînt foarte îndepărtate din punct de vedere evolutiv.

Primele date au fost furnizate de Merril și colab. (1971), care au folosit fibroblaști umani din piele, de la bolnavi de galactozemie, caracterizați prin absența enzimei specifice α -D-galactoz-1-fosfat-uridil transferaza. Ca donatori de material genetic au fost folosiți doi fagi transductori și anume: unul λ -p-gal ($K^+T^+E^+$), care poartă operonul gal complet, și altul defectiv λ -p-gal ($K^+T^-E^+$), cu o mutație amber în gena T^* . După infectarea cu primul fag, activitatea transferazică ajunge între 5,9 și 29% din normal, datorită exprimării genei bacteriene T în celula eucariotă. După 4—5 zile, $\sim 0,2\%$ din ARN total este reprezentat de ARNm-T, în timp ce în celulele neinfectate cu fag proporția acestuia este mai mică, de 0,005%. Infecția cu fagul defectiv este lipsită de orice efect.

Experiențele au fost confirmate de Horst și colab. (1975), care au utilizat, de asemenea, fibroblaști din piele, de la bolnavi cu deficiență severă de β -galactozidază. După incubarea celulelor umane cu fagul transductor λ -p-lac, genomul fagic se exprimă prin manifestarea unei activități β -galactozidazice în trei din 19 experiențe, iar în cazul incubării cu ADN λ -p-lac, în 4 din 16.

Doy și colab. (1973) au folosit fagii $\Phi 80$ lac⁺ și λ gal⁺ pentru a trata culturile haploide de *Lycopersicon esculentum* (tomate) și de *Arabidopsis thaliana* (gîscariță), care formează bine calus pe medii cu glucoză sau zaharoză, dar mor lent pe medii cu lactoză sau galactoză. Infectarea celulelor din calus mărește perioada de supraviețuire și de creștere a calusului, în prezența glucidelor netolerate inițial, cu cel puțin 15 săptămîni în cazul genelor gal și cu 32 de săptămîni în cazul genelor lac. Structura, activitatea și particularitățile imunochimice ale enzimelor produse au fost cele ale β -galactozidazei bacteriene, ceea ce demonstrează că supraviețuirea

* K-kinaza, T-transferaza, E-epimeraza, cele trei enzime ale căii Leloir de metabolizare a galactozei la om și la *E. coli*.

și creșterea celulelor vegetale se datorează transferului, menținerii, transferirii și traducerii genelor bacteriene în enzime funcționale în celulele eucariote.

Mecanismul transgenozii nu este cunoscut. Nu se cunoaște modul în care ADN străbate barierele celulare, cum evită degradarea de nucleaze și cum ajunge în regiunea în care este transeris și tradus. După Ledoux (1971), ADN bacterian s-ar integra în cromosomul celulei vegetale, în timp ce după Hotta și Stern (1971) ar rămâne intact, dar neintegrat ca profag.

Aplicații practice. Aceste date demonstrează posibilitatea utilizării fagilor de transducție specializată ca vectori de gene bacteriene la anumite celule eucariote și deschide perspectiva folosirii lor ca un instrument important în special în studiile de genetică aplicată, în tehnologii aplicabile plantelor de cultură. După Merril și Stanbro (1974), acest fenomen ar putea avea o semnificație evolutivă, demonstrând posibilitatea eliberării organismelor — în anumite cazuri — de constrîngerile impuse de izolarea genetică.

Evoluția genomului bacterian

„Este probabil că nu vom cunoaște
niciodată în detaliile lor, drumurile
urmate de evoluție ...”

F. JACOB

Deși diferitele scheme referitoare la originea și evoluția microorganismelor* au numeroase puncte de vedere divergente, se poate aprecia că unele microorganisme cu organizare și biochimie avansate, erau prezente pe Pământ încă de acum peste 3 miliarde de ani (Schopf, 1970). Tranziția de la formele de viață primitive, precursori ale bacteriilor actuale — numite *protocelule* sau *progenoti* (Woese, 1977, 1982) — la celulele procariote a avut loc într-o perioadă cuprinsă între 3 și 4 miliarde de ani. Se consideră, de asemenea, că toate genomurile contemporane, inclusiv cele din mitocondrii și cloroplaste, derivă, în ultimă instanță, dintr-un genom unic, aparținând unei entități unice, probabil celulare, care a fost strămoșul tuturor formelor de viață existente în prezent. Această concepție este în acord cu caracterul aproape universal al codului genetic. Abaterile de la codul genetic standard, descrise în cazul mitocondriilor, sînt prea mici și prea variabile pentru a justifica ipoteza că aceste organite au derivat din linii celulare total diferite, care au luat naștere independent, din materia neanimată.

O serie de scheme au încercat să prezinte ordinea în care au apărut proprietățile metabolice ale noilor celule în cursul evoluției (Hall, 1971; Dickerson și colab., 1976; Morris, 1977 — ș.a.). Broda (1975) a propus următoarea succesiune în timp a evoluției proceselor metabolice: a) fermentație anaerobă → b) fotosinteză de tip bacterian (tip primitiv) → fotosinteză mai complexă, asemănătoare celei a plantelor superioare (ca la cianobacterii) → respirație aerobă. În cadrul acestor scheme numai respirația anaerobă (în care compușii organici și anorganici înlocuiesc O_2 ca acceptori de electroni) ocupă o poziție controversată. În schimb, toate aceste scheme au o trăsătură comună, în sensul că pornesc de la premisa că numărul genelor și al enzimelor corespunzătoare, prezente în organismele primitive, a fost cu mult mai mic decît cel al microorganismelor aerobe actuale, care sînt capabile de un metabolism mult mai sofisticat. Acest punct de vedere implică o evoluție a genomului bacterian de la simplu la complex de-a lungul milioane de ani.

După Riley și Anilionis (1978), evoluția genomului bacterian are două faze distincte:

1) *Faza evoluției prebiotice* a corespuns perioadei de apariție a primilor polimeri, a primelor molecule de proteine și acizi nucleici, care s-au

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 423.

agregat pentru a forma *protocolule* sau *progenoti*, dotate cu informația necesară pentru efectuarea unor conversii metabolice simple. Ulterior, acestea au dobândit capacitatea de replicare a genomului, de exprimare a genelor și de diviziune.

2) Faza a doua, care continuă și în prezent, a permis *dezvoltarea celulelor procariote primitive și apariția unor organisme mai complexe*, dotate cu cicluri de catabolism și de biosinteză complexe, interrelate, și cu mecanisme subtile de reglare ca răspuns la condițiile de mediu. Evoluția genomului bacterian în această fază care a corespuns unei dezvoltări complexe a funcțiilor metabolice și structurii celulelor s-a realizat, în principal, printr-o creștere progresivă a informației genetice, dar și prin modificări ce s-au efectuat fără creșteri nete sau chiar cu pierderi din conținutul în informație genetică.

Evoluția genomului bacterian s-a realizat, în mare, pe două căi, și anume prin creșterea conținutului în informație genetică și prin modificarea informației genetice existente într-o celulă.

Modalități de creștere a genomului bacterian

Teoretic, ca și pe baza datelor experimentale, creșterea genomului bacterian se poate realiza : 1) prin incorporarea de material genetic exogen sau 2) prin duplicarea (dublarea) unor gene prezente în structura sa. (fig. 257). Importanța relativă a celor două mecanisme pentru evoluția genomului bacterian și pentru capacitatea bacteriilor de a dobîndi prin evoluție funcții noi este greu de apreciat.

Adăugarea de ADN din surse externe este un proces relativ bine cunoscut, datorită descoperirii plasmidelor și capacității unora dintre ele (plasmidele conjugative) de a media transferul de material genetic în natură, uneori cu un grad înalt de promiscuitate, la un spectru larg de gazde și de a se integra reversibil în genomul bacteriei-gază. Semnificația evolutivă a plasmidelor a crescut mult prin cunoașterea structurii lor genetice și evidențierea faptului că pot purta o gamă largă de determinanți genetici, care pot conferi bacteriilor-gază nu numai rezistența la unele antibiotice, ci și capacitatea de a sintetiza sau de a cataboliza anumite substraturi și chiar de a face sinteza unor structuri celulare, ca de exemplu pilii de sex. Incorporarea unora din genele plasmidiale în cromosomul bacterian și menținerea lor ca atare, în condiții în care proprietățile codificate de ele sînt adecvate mediului în care trăiesc bacteriile respective, reprezintă, în mod evident, una din modalitățile certe de îmbogățire cu informație genetică de proveniență exogenă (fig. 257).

Creșterea genomului bacterian prin duplicarea unor gene prezente în structura sa a fost demonstrată prin numeroase cercetări experimentale. Ea s-ar realiza, după Weisberg și Adhya (1977), prin fenomene de crossingover nelegitim sau inegal între segmente ale unor copii ale genomului respectiv, probabil în cursul replicării cromosomului. Rezultă, după cum se vede din fig. 257, două copii adiacente ale segmentului respectiv

(*duplicare în tandem*) și apariția unui singur linkaj nou. În principiu, acest gen de duplicări pot integra segmente cu lungimi variabile, de la o genă până la aproape o treime din genom.

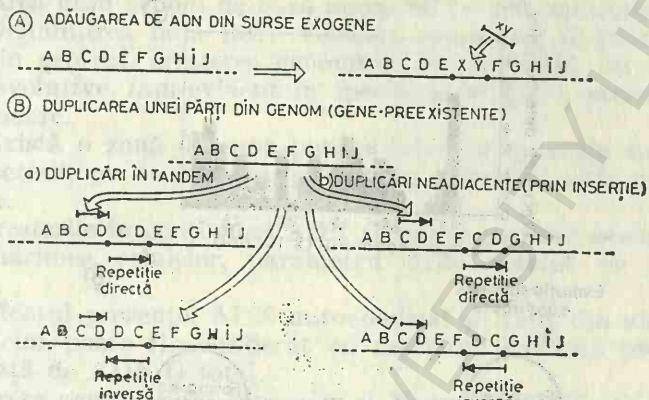


Fig. 257. — Modalitățile de creștere a genomului bacterian. A—J, segment de genom bacterian. Săgețile mici situate deasupra segmentului cromosomal A—J indică genele rezidente în genom care sînt duplicate, iar cele situate sub el, adăuile produse în genom. Săgeata indică direcția de citire a informației. Punctele mari negre marchează situsurile la nivelul cărora are loc fuziunea genelor duplicate (după Riley și Anilionis, 1978).

Al doilea tip de duplicare (*duplicare neadiacentă, inserțională*) este realizat prin acțiunea elementelor genetice transpozabile (secvențe de inserție și transpozoni). Acestea determină inserția unei copii a unei secvențe preexistente, într-o altă poziție pe cromosom, fie în aceeași orientare, fie în orientare opusă celei originare. Acest mod de duplicare implică formarea a două puncte de fuziune sau de linkaj (fig. 257).

Dublarea genomului. Posibilitatea dublării (duplicării) unor segmente genomice mari face posibilă și ipoteza unei dublări a întregului genom, care poate determina rapid o creștere masivă în rezerva de informație genetică celulară. Genomul dublat ar putea fi utilizat ca „material brut”, de la care, prin mutații sau alte căi, s-ar putea realiza diversificarea particularităților structurale și de metabolism.

Wallace și Morowitz (1973) au analizat mărimea genomului unui spectru larg de bacterii, din care au exclus în mod deliberat formele parazite intracelulare (*Rickettsia* și *Chlamydia*). Reprezentarea grafică a distribuției genomurilor bacteriene, în funcție de mărimea acestora, sugerează posibilitatea unei evoluții a procariotelor pe baza dublării genomului. La baza acestei evoluții ar sta o celulă primitivă de tipul micoplasmelor actuale, avînd un genom primitiv, numit de autori *genesistron* ($\sim 0,5 \times 10^9$ dal), de la care prin dublarea ADN s-ar forma genomul de *Acholeplasma* ($\sim 1 \times 10^9$ dal). Evoluția genomului ar fi urmat două căi posibile: 1) creșterea mărimii cromosomului prin dublarea genomului (inițiată, prin legarea a doi genesistroni), care ar continua, ducînd la apariția eubac-

teriiilor, cu o structură și fiziologie complicată, bazată însă pe un cromosom unic; 2) creșterea numărului de cromosomi, urmată de modificarea organizării lor, concomitent cu evoluția spre celulele eucariote (fig. 258).

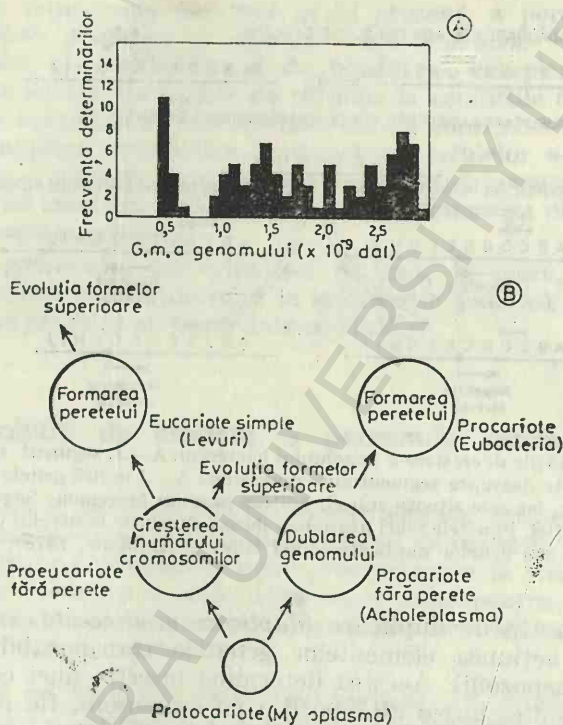


Fig. 258. — Evoluția genomului bacterian prin fenomene de duplicare. A. Reprezentarea grafică a distribuției genometelor bacteriene, în funcție de mărimea lor. B. Evoluția organismelor după ipoteza lui Wallace și Morowitz (1973), având la origine o celulă protocariotă asemănătoare micoplasmelor actuale.

Sparrow și Naumann (1976), analizând datele referitoare la mărimea genomului la ~ 2400 de specii diferite, au luat în considerație numai dimensiunea minimă a genomului individual cunoscut la organisme aparținând la 23 de grupuri filogenetice majore (tabelul nr. 35). S-a considerat că această dimensiune reprezintă, teoretic, cantitatea minimă de ADN (sau ARN) necesară fiecărui grup filogenetic sau cel puțin reprezentanților fiecărui grup. Aceste valori în ansamblu sugerează existența unei serii continue de dublări ale cantității de ADN. Pentru a testa grafic acest concept și validitatea lui statistică, au înregistrat valorile respective, în funcție de o secvență teoretică de dublări ale unui „genom elementar”, exprimată ca 2^n (n reprezintă numărul de dublări ale genomului). Ei au considerat ca genom minimal, de bază, ARN viroidal (~ 300 nucleotide; $\sim 100\,000$ dal; $1,65 \times 10^{-7}$ pg).

Fig. 259 sugerează existența unei mari apropieri între valorile minime determinate ale ADN la diferitele specii studiate, în raport cu seria de dublări teoretice, și demonstrează existența unei periodicități exponen-

țiale de opt grade de mărime ($10^{-7} \rightarrow 10$). Sparrow și Naumann (1976) ajung la următoarele concluzii:

1) Analiza datelor referitoare la cantitatea minimă de ADN per genom (ADN/G) permite concluzia existenței unei continuități evolutive, prin dublarea unui genom de bază ancestral (~ 300 nucleotide).

2) Delimitarea netă între virusuri procariote și eucariote duce la ideea că, în general, creșterea genomului este paralelă cu creșterea complexității evolutive; fapt evident în special la virusuri, procariote și eucariote inferioare.

3) Există o zonă de suprapunere între eubacteriile cu genom mare și cianobacterii, pe de o parte, și levurile și protozoarele cu genom mic, pe de alta.

4) Creșterile în conținutul ADN/G sînt în general asociate cu o creștere în mărimea celulelor, parametru strîns corelat cu multe funcții fiziologice.

5) Efectul prezenței ADN mitocondrial și ADN din cloroplaste asupra calculelor poate fi considerat ca neglijabil datorită proporției neînsemnate față de ADN/G total.

Pe baza acestor date, Sparrow și Naumann (1976) au introdus *conceptul de criptopoliploidie*, pentru a caracteriza fenomenul de dublare a genomului, observat inițial la bacterii, plante superioare și fungi. Convențional, poliploidia denotă o multiplicare a numărului cromosomilor cu menținerea în general constantă a mărimii lor, dar cu o creștere corespunzătoare a cantității de ADN. Criptopoliploidia implică o creștere în mărimea genomului, prin creșterea în mărime a cromosomilor. Mai concret poliploidia înseamnă mai mulți cromosomi și mai mult ADN, iar criptopoliploidia cromosomi mai mari. O serie de date concrete susțin existența acestui mecanism de dublare a genomului.

Zipkas și Riley (1975, 1979) au arătat că genele implicate în catabolismul glucozei la *E. coli* sînt situate în 5 grupuri („cluster”) de gene, localizate pe harta circulară a genomului la distanțe de 90° , respectiv 180° (fig. 260). Alte gene, cu funcții biochimice înrudite, au fost găsite situate, la distanțe de 90° și 180° . Situații similare au fost descrise la *Klebsiella*, *Salmonella*, *Streptomyces*, *Nocardia* etc. Întrucît în prezent se consideră că localizarea genelor la $90^\circ/180^\circ$ nu este un artefact, ci ilustrează o situație biologică reală, se poate trage concluzia că în genomul *E. coli* această poziție ar fi consecința a două dublări secvențiale ale genomului în trecut, urmate de o evoluție divergentă a copiilor genelor duplicate.

Stanier, Rippka și colab. (1979) au adus argumente suplimentare din studiul mărimii genomului la 128 de specii de *Cyanobacteria*, aparținînd grupurilor taxonomice majore. Datele obținute permit concluzia că la cianobacterii există o corelație strînsă între mărimea genomului și complexitatea morfologică, deoarece tulpinile cu un grad mare de diferențiere morfologică au, aproape invariabil, genomuri mai mari decît cele simple. Valorile mărimii genomurilor respective se grupează în patru categorii distincte: 1) $2,21 \pm 0,31 \times 10^9$ dal; 2) $3,56 \pm 0,37 \times 10^9$ dal; 3) $5,0 \pm 0,39 \times 10^9$ dal și 4) $7,4 \pm 0,45 \times 10^9$ dal. Aceste valori sînt foarte apropiate de cele care ar fi obținute printr-un proces de dublare genomică, implicînd fuziunea unui genom mic ancestral, de $1,2 \times 10^9$ dal, pentru a crea genomuri cu 2 ($2,4 \times 10^9$), 3 ($3,6 \times 10^9$), 4 ($4,8 \times 10^9$) și

Tabelul nr. 35

Genomurile cu dimensiuni minime descrise la 23 de grupuri filogenetice majore.
Cifrele din prima coloană corespund punctelor din figura nr. 259

Grupul filogenetic	Virusul sau organismul	ADN (sau ARN) per genom (pg)
1. ARN viroidal	Viroidul cartofului	$1,65 \times 10^{-7}$
2. Virusuri ARN m.c.	Virusul satelit al necrozei tutunului	$6,60 \times 10^{-7}$
3. Virusuri ARN d.c.	Virusul S. L. de la <i>Penicillium stoloniferum</i>	$1,53 \times 10^{-6}$
4. Virusuri ADN m.c.	Virusul minor de la soarece	$2,48 \times 10^{-6}$
5. Virusuri ADN d.c.	Virusul vacuolant din rinichiul de iepure	$4,62 \times 10^{-6}$
6. Bacterii	<i>Mycoplasma arginini</i> , <i>M. bovis genitalium</i>	$6,6 \times 10^{-4}$
7. Cianobacterii	<i>Anabaena variabilis</i>	$5,0 \times 10^{-3}$
8. Mixomicete	<i>Dictyostelium discoideum</i>	$1,68 \times 10^{-1}$
9. Fungi	<i>Saccharomycoides ludwigii</i>	$6,0 \times 10^{-3}$
10. Alge eucariote	<i>Chlorella ellipsoides</i>	$5,0 \times 10^{-2}$
11. Gimnosperme	<i>Podocarpus dactyloides</i>	5,3
12. Angiosperme	<i>Bulbostylis capillaris</i>	$3,6 \times 10^{-1}$
13. Protozoare	<i>Plasmodium berghei</i>	$2,0 \times 10^{-2}$
14. Porifere	<i>Dysidea crawshagi</i>	$5,5 \times 10^{-2}$
15. Celenterate	<i>Cassiopeia</i> sp.	$3,3 \times 10^{-1}$
16. Anelide	<i>Cirratulus grandis</i>	$7,0 \times 10^{-1}$
17. Nematode	<i>Caenorhabditis elegans</i>	$8,8 \times 10^{-2}$
18. Moluște	<i>Lottia gigantea</i>	$4,3 \times 10^{-1}$
19. Crustacee	<i>Sacculina</i> sp.	$7,0 \times 10^{-1}$
20. Insecte	<i>Dixa obscura</i>	$1,56 \times 10^{-1}$
21. Echinoderme	<i>Dermasterias imbricata</i>	$5,4 \times 10^{-1}$
22. Cordate inferioare	<i>Ascidia atra</i>	$1,58 \times 10^{-1}$
23. Vertebrate	<i>Tetraodon fluviatilis</i>	$3,9 \times 10^{-1}$

6 ($7,2 \times 10^9$) copii ale genomului ancestral. Genomul redundant creat prin aceste fuziuni a reprezentat, probabil, suportul molecular de la care s-a format informația genetică nouă, prin mutații repetate, ce au permis evoluția ulterioară a mării diversități morfologice caracteristică cianobacteriilor.

Mecanismul dublării genomurilor într-o celulă primitivă este necunoscut. El s-ar putea realiza, după Zipkas (1975), pe mai multe căi: prin recombinare omologă între două genomuri circulare progene, prin dimerizarea unor genomuri progene, prin incapacitatea unor molecule replicative concatenate de a se monomeriza sau, poate, prin mecanisme fără echivalent actual.

Dobindirea de noi funcții prin modificarea genelor existente

În ultimii ani au fost realizate o serie de cercetări experimentale de „evoluție dirijată” simulind în laborator procesele prin care bacteriile pot căpăta funcții metabolice noi. În acest scop, diferite populații bacte-

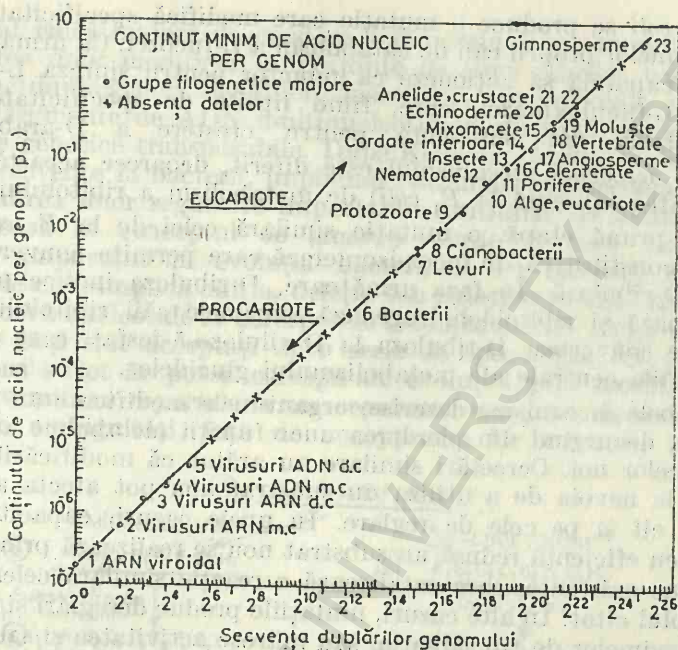
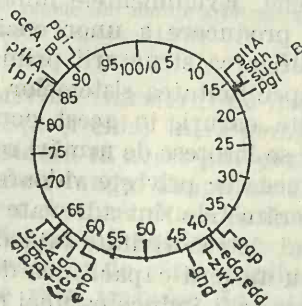
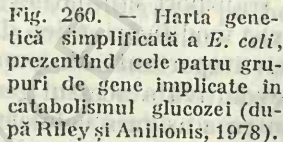


Fig. 259. — Valorile minime ale ADN sau ARN per genom pentru 23 de grupuri filogenetice de organisme, virusuri și viroizi, în funcție de o secvență teoretică a dublărilor genomice. Semnele X în dică puncte de dublare pentru care nu se cunoaște o valoare minimă corespunzătoare unui grup major. Eucariotele, cu excepția levurilor, au valori mai mari de 2^{18} , iar procariotele, mai mici de 2^{15} .



riene au fost supuse unor presiuni selective puternice, pentru a efectua o serie de activități metabolice, care erau absente în fenotipul lor inițial. În interpretarea rezultatelor s-a pornit de la premisa că strategiile mutaționale ale bacteriilor actuale, evidențiate în condiții experimentale în laborator, sint similare celor utilizate în cursul evoluției lor naturale.

Le Blanc și Mortlock (1971), precum și St. Martin și Mortlock (1977) au studiat modificările mutaționale necesare pentru ca *E. coli* K 12 sau *Klebsiella aerogenes* să utilizeze D-arabinoza, ca unică sursă de carbon.

La *E. coli* se produce o mutație care modifică specificitatea de inducție a enzimelor proprii căii de catabolism a L-fucozei. Ca urmare, D-arabinoza este capabilă să acționeze ca inductor pentru sinteza L-fucoz-izomerazei și L-fuculokinazei, care, fiind lipsite de specificitate, asigură utilizarea slabă, dar suficientă pentru creștere a D-arabinozei.

La *K. aerogenes* mecanismul este diferit, deoarece această bacterie are capacitatea (absentă la *E. coli*) de metabolism a ribitolului.

Într-o primă etapă, o mutație similară celei de la *E. coli* induce producerea constitutivă de fucoz-izomerază care permite conversia S-arabinozei la D-ribuloză. În faza următoare, D-ribuloza induce producerea de ribulokinază și ribitoldehidrogenază, enzimele căii ribitolului. Aceste două enzime convertesc D-ribuloza la D-xiluloza-5-fosfat, care este catabolizat pe căile centrale ale metabolismului glucidelor.

În ambele mecanisme descrise, organismele modificate au o serie de dezavantaje, decurgind din pierderea unor funcții metabolice asociate cu dobândirea celor noi. Cercetări similare au arătat că modificările ce apar ca răspuns la nevoia de a utiliza un substrat nou pot afecta atât genele structurale, cât și pe cele de reglare. În unele cazuri, capacitatea de a metaboliza cu eficiență redusă un substrat nou se realizează prin utilizarea unor proteine existente, care catalizează o reacție similară celei necesare, ca în exemplul citat. În alte cazuri, mutațiile produc dereglări și/sau supraproducția enzimelor de tip sălbatic, sau măresc activitatea și/sau specificitatea sistemelor de transport, care asigură concentrații mai mari de substrat non, accesibil enzimelor celulare.

Substratul molecular al acestui câștig de funcții metabolice este reprezentat de prezența în genom a informației genetice *aproape adecvată* pentru a codifica funcția respectivă, în momentul în care ea este impusă celulei bacteriene. Evenimentele mutaționale care o pun în valoare afectează rata de producere a unor enzime, exprimarea unor gene anterior „tăcute”, modificarea structurii primare și specificității enzimelor, exprimarea și/sau specificitatea sistemelor de transport etc. (Riley și Anilionis, 1978). În multe cazuri, în acest context, modificări mici din punct de vedere genetic se însoțesc de urmări relativ importante din punct de vedere metabolic. În ceea ce privește valoarea evolutivă a acestui gen de modificări, se consideră că ele sînt adecvate pentru a asigura celulelor bacteriene un anumit grad de reactivitate față de prezența în mediu a unor substraturi noi. Ele nu au însă capacitatea de a produce modificări evolutive mai importante, cum ar fi inducerea unei noi căi metabolice într-un microorganism primitiv sau a capacității de a capta și utiliza noi forme de energie.

În concluzie, pe baza analizei particularităților genetice ale organismelor, cât și a datelor experimentale se poate afirma că procesele care au stat la baza evoluției genomului bacterian au fost complexe. Ele au implicat participarea mai multor organisme care, acționînd paralel, au determinat transformarea unui genom simplu și mic al unei bacterii primitive ancestrale, la nivelul de complexitate caracteristic bacteriilor actuale. În ceea ce privește importanța lor relativă se presupune că duplicarea unor gene, a unor segmente genetice mai mari și chiar a întregului genom a

reprezentat calea majoră de creștere a dimensiunii genomului. Se adaugă posibilitatea unor modificări importante de tipul marilor rearanjări cromosomale, duplicărilor, delețiilor, inserțiilor, inversiunilor și transpoziției unor segmente de ADN multinucleotidice, de tipul celor mediate de elementele genetice transpozabile. După Kopecko (1980), toate aceste modificări, frecvente la bacterii, implicând rearanjări cromosomale, pierderea sau dobândirea unor segmente importante cantitativ de material genetic, se încadrează în conceptul de „macroevoluție”*, care ar reprezenta un factor important în evoluția bacteriilor. În schimb, evenimentele mutaționale care implică adăugarea, deleția sau substituția unui singur nucleotid sau câtorva nucleotide ar corespunde fenomenului de „microevoluție”** (fig. 261). Deși sunt acceptați de o serie de specialiști, cei doi termeni, care în sens strict ar putea corespunde evoluției prin modificări majore și respectiv minore raportate la un eveniment unic, au dezavantajul unei importante ambiguități, față de accepțiunea lor curentă, tradițională.

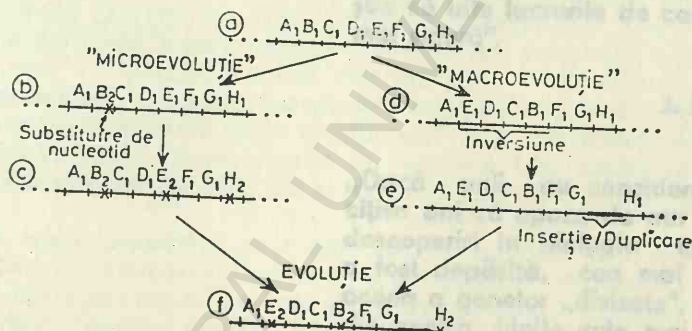


Fig. 261. — Reprezentarea schematică a căilor de evoluție la bacterii. Liniile orizontale reprezintă porțiuni din cromosomii bacterieni în care genele sunt notate arbitrar A, B ... H. Mutațiile sunt notate cu X (după Kopecko, 1980).

Deși există numeroase probe privind transferul de material genetic mediat de plasmide, cu mare frecvență și chiar între genuri de bacterii diferite, Riley și Anilionis (1978) consideră că acest proces nu ar fi reprezentat un mecanism evolutiv major de-a lungul timpului. Cel mai adesea s-a considerat că evoluția bacteriilor a fost rezultatul unui proces foarte lent, reprezentat de apariția unor mici modificări în structura ADN cromosomal — mutațiile — urmate de selecția de către mediu a celor utile și acumularea mutațiilor benefice prin transfer de material genetic intercelular și recombinare genetică. La baza acestei concepții a stat faptul că, deși mutațiile apar cu o frecvență relativ mică (o mutație pentru

* Termenul de *macroevoluție* (Goldschmidt, 1940) corespunde, în accepțiunea sa din biologia generală, evoluției transspecifice, care în cursul erelor geologice a dus la apariția categoriilor taxonomice superioare (genuri, familii și ordine), cu caractere noi. Numită de Simpson (1944) „quantum evolution” (engl. quantum-mărime, total, cuantumul), macroevoluția implică o comutare mai mult sau mai puțin rapidă a unei populații mici spre o nouă stare de echilibru distinct, deosebit de cel ancestral.

** *Microevoluția* (Goldschmidt, 1940) corespunde, în aceeași accepțiune, evoluției infra-specifice sau „speciației” și include toate procesele de formare și de diferențiere a speciei, determinate de acțiunea combinată a diferiților factori evolutivi (Rieger, Michaelis și Green, 1976).

un caracter dat la 10^6 — 10^8 celule), apariția lor este deosebit de importantă ținând seama de ritmul rapid de diviziune a celulelor bacteriene și de mărimea populațiilor pe care le formează. Pe baza datelor experimentale, Cohen și colab. 1978 ; Kopecko, 1980) consideră însă că, în ultimă instanță, evoluția bacteriilor ar reprezenta atît rezultatul acumulării în timp a modificărilor majore, cît și a celor minore ale ADN.

Această evoluție este un proces continuu, care se desfășoară, am putea spune, sub ochii noștri. Semnificativ este faptul că, deși posedă atîtea mecanisme sofisticate de creștere și modificare a aranjării genelor în cromosom, structura genetică a bacteriilor este stabilă de-a lungul a mii de generații, fapt reflectat de stabilitatea hărților genetice cromosomale. Aceasta demonstrează, după Riley și Anilionis (1978), existența unei „forțe conservatoare”, care acționează pentru a stabiliza configurația genetică a genomului bacterian, în fața forțelor ce acționează pentru a o modifica.

Transcrierea inversă și dogma Centrală a biologiei moleculare

DOGME INFIRMATE

„Este important, uneori, ca știința să știe să uite lucrurile de care era cea mai sigură”.

J. ROSTAND

„Dacă unii au considerat acum câțiva ani că epoca de aur a marilor descoperiri în biologia moleculară a fost depășită, cea mai recentă, aceea a genelor „divizate”, arată că, din contra, ideile cele mai solid înrădăcinate sînt deschise discuțiilor și că organizarea vieții este chiar mai neașteptată și mai pasionantă decît s-a putut imagina”.

A. DANCHIN
P. SLONIMSKI

„Este soarta obișnuită a adevărilor noi, de a începe ca erezii și de a sfîrși ca superstiții”.

T. H. HUXLEY

...într-o manieră care să fie înțeleasă de către cititorii noștri. Într-o astfel de situație, este necesar să se facă o traducere în limba noastră, care să fie cât mai apropiată de originalul. Acest lucru este posibil numai dacă traducătorul are o cunoaștere bună atât a limbii de origine, cât și a limbii de destinație. Altfel, traducerea va fi doar o copie mecanică, care nu va transmite nici sensul, nici stilul originalului.

...Este important, atunci, ca traducătorul să fie nu doar un lingvist, ci și un om cu o bogată cultură generală. El trebuie să fie capabil să înțeleagă contextul în care este folosită limba și să poată transmite acest context în limba noastră. Altfel, traducerea va fi doar o copie mecanică, care nu va transmite nici sensul, nici stilul originalului.

1. ROSTAND

...Dacă nu am considerat acum că este un câștig de a mai avea în biografia noastră un astfel de mare om, atunci ar fi o pierdere. El a lăsat o moștenire bogată de lucrări științifice, care ne ajută să înțelegem mai bine lumea în care trăim. Este o onoare să-l cunoaștem și să-l admirăm.

A. DANCIU P. STONINSKI

...Este vorba de o lucrare deosebită, care ne oferă o privire nouă asupra unor probleme care au preocupat pe gânditori de-a lungul timpului. Este o carte care merită să fie citită de toată lumea interesată de știință și cultură.

T. BULEY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Transcrierea inversă și dogma centrală a biologiei moleculare

„Transcriplaza inversă, acest nume romantic intrat în vorbirea curentă ...”

D. BALTIMORE

Crick (1958), într-o expunere asupra proteinelor, a emis ipoteza că în sistemele biologice transferul de informație are loc numai unidirecțional, de la ADN \rightarrow ARN \rightarrow proteine și că transferul de la o proteină la alta sau de la proteine la acizii nucleici este imposibil. Această ipoteză, emisă într-o perioadă în care cunoștințele erau lacunare (transcrierea genetică nu fusese evidențiată), a fost denumită de Crick **dogma centrală a biologiei moleculare**. Datorită naturii ei extrem de largi și a lipsei totale de probe contrarii, această ipoteză a devenit paradigma biologiei contemporane. (Olby, 1975). Acest punct de vedere a fost întărit de Watson (1965), care a afirmat că ARN nu acționează niciodată ca matriță pentru ADN.

Ideea unei transcrieri posibile ARN \rightarrow ADN a fost avansată de Temin (1964), în încercarea de a explica oncogeneza produsă de virusurile ARN. El a presupus existența unui ADN intermediar, complementar față de ARN viral, necesar pentru integrarea virusului oncogen în celulele gazdei. În sprijinul acestei ipoteze pledează două observații : 1) adăugarea unor inhibitori ai sintezei de ADN, în primele 12 ore de la expunerea celulelor la ribovirusurile oncogene, împiedică infecția și transformarea oncogenă și 2) formarea virionilor de oncornavirusuri este sensibilă la actinomicină D și pare să implice sinteza de ARN dependentă de ADN.

În anul 1970, concomitent, Temin și Baltimore, lucrând cu virusul Rauscher al leucemiei murine și cu virusul sarcomului Rous (VSR), au evidențiat existența transcrierii inverse și au izolat și identificat enzima activă. Sinteza ADN pe matriță de ARN a fost demonstrată prin incubarea unor suspensii purificate de virioni, în prezența Mg^{2+} sau Mn^{2+} și a celor patru dezoxiribonucleozid trifosfați : dATP, dGTP, dCTP, cel de-al patrulea fiind timidina tritiată (dTTP). Ei au evidențiat astfel încorporarea timidinei tritiate într-un produs polimer (ADN), sensibil la hidroliza cu DNază. Pretratarea amestecului cu RNază împiedică reacția, fapt care demonstrează că ARN viral este esențial pentru polimerizare. Produsul obținut este un ADN complementar față de anumite segmente ale ARN viral, cu dimensiuni mici (6–8S) în raport cu mărimea matriței de ARN (~70 S). El este prezent, cel mai frecvent, sub forma hibridă ARN–ADN (Spiegelman și colab., 1970 ; Fuginaga și colab., 1970), dar și sub forma unor molecule mici, libere, monocatenare.

Enzima izolată a fost denumită inițial, de Temin, *ADN polimeraza dependentă de ARN pentru a sugera necesitatea unei matrițe de ARN, pentru*

sinteza de ADN. Ulterior, demonstrându-se că ea poate să folosească drept matriță și ADN (deși mai puțin eficient) (Duesberg și colab., 1971), Temin i-a schimbat denumirea în *ADN polimerază dirijată de ARN* („RNA-directed DNA polymerase”). O adevărată mai largă a avut denumirea de *transcriptază inversă* („reverse transcriptase”), propusă de un corespondent anonim al revistei „Nature”, deși Temin o consideră ca ambiguă. A mai fost propusă denumirea de Balti—Teminază, derivată de la numele descoperitorilor ei. Transcriptaza inversă este o enzimă cu g.m. de 160 000—170 000 dal (virusul mieloblastozei aviare) sau de 70 000—90 000 dal (virusul Rauscher). Este prezentă în zona corpusecului central al virionului (2—5 molecule/virion Rous), din care poate fi eliberată prin tratare cu detergenți, pentru a rupe învelișul lipidic. Ea utilizează ca matriță ARN, hibridi ARN—ADN și ADN, dar acționează numai ca ADN polimerază (polimerizează numai dezoxinucleotide) și niciodată ca ARN polimerază.

Mecanismul molecular al activității transcriptazei inverse

După modelul lui Baltimore (1971) (fig. 262 A), inițial s-ar forma un complex replicativ, care conține molecule de ADN pe cale de creștere, legate de ARN viral, ce ar juca rol de matriță și de amorsă (primer), fie direct,

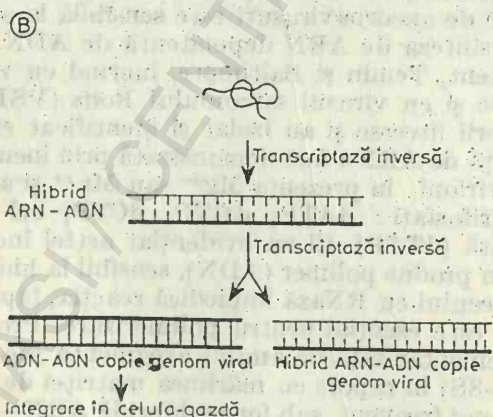
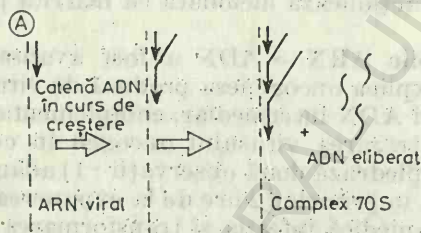


Fig. 262. — A. Secvența reacțiilor produse de transcriptaza inversă virală, în cursul sintezei de ADN pe matriță de ARN, după modelul lui Baltimore. B. Reacțiile produse de transcriptaza inversă în celulele animale infectate cu oncornaviruri.

fie prin intermediul unei molecule mici de ARN primer. Matrița de ARN 70S are o structură eterogenă, cu numeroase extremități 3' OH, fiind alcătuită din subunități 20—35 S și din segmente mai mici, unite prin legături de H. Ca urmare, transcriptaza inversă ar determina formarea unor mici

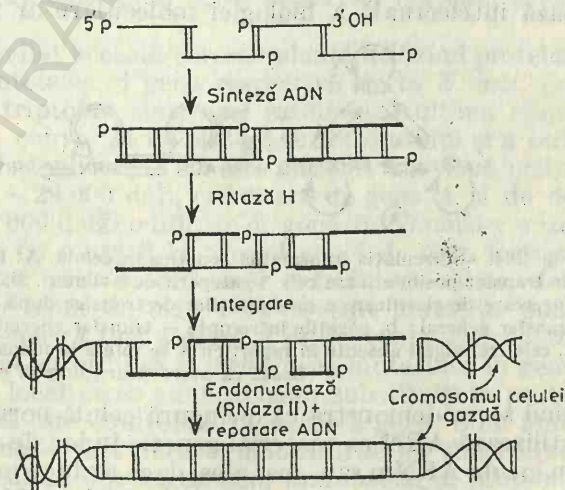
secevențe de ADN, legate covalent sub formă de hibridi ARN—ADN, de-a lungul ARN viral, și nu a unei molecule unice, continuă, de ADNc.

Modelul lui Hurwitz (1973) include activitatea unei enzime asociată cu polimeraza în virioni, RNaza H (*H* de la hibridază), descoperită de Molling (1971). Hibridaza degradează *in vitro* homoribopolimerii, numai în prezența homodezoxiribopolimerilor. *In vivo*, ea ar elibera ADN din moleculele hibride ARN—ADN, care ar fi copiate la ADN d.e. După Hurwitz, nu este necesară transcrierea la ADN a tuturor regiunilor din ARN, înainte de integrare. În cursul sintezei de ADN, RNaza H ar îndepărta numai anumite porțiuni din molecula de ARN, situate la cele două extremități, pentru a crea regiuni de ADN m.c. Extremitățile acestui ADN m.c. ar fi utilizate de mecanismele enzimatice ale celulei pentru a încorpora hibridul ARN—ADN în cromosomul gazdei. După aceea abia, o endonuclează nucleară ar îndepărta ARN, și sistemul reparator de ADN al celulei-gazdă ar converti „golurile” rămase, la ADN cu structură continuă (fig. 263). În sprijinul acestei ipoteze pledează prezența în virioni a unei ligaze și a unei enzime de tipul proteinei genei 23 de la fagul T4, care ar putea participa la procesul de integrare (Mizutani și Temin, 1971).

Semnificația biologică. Transcriptazele inverse au fost izolate de la numeroase oncornavirusuri, ea și din celulele umane și murine normale, dar în cantități mai mici decât în celulele tumorale sau leucemice. Transcrierea inversă a fost semnalată și la *E. coli*, la care ADN polimeraza I poate copia — în anumite condiții — ARN natural sau sintetic la ADN (Cavalieri și Carroll, 1970).

În cazul virusurilor oncogene cu genom ARN, ea ar avea, după Temin (1970, 1971), un rol important în oncogeneză (fig. 262 B), fapt con-

Fig. 263. — Rolul ADN polimerazei dependentă de ARN și al RNazei H în replicarea virală, după Hurwitz (1980). Linile subțiri reprezintă ARN viral, iar cele groase, ADN nou sintetizat. Structura helicală corespunde cromosomului gazdei.



firmat de Hanafusa și colab. (1971), care au demonstrat că VSR deficient în transcriptază inversă nu este infecțios și este lipsit de activitate transformantă. Transcrierea inversă ar putea fi o modalitate adițională de biosinteză de ADN sau un mecanism de stocare a informației somatice, activ în diferențiere, în sinteza de anticorpi și în memorie. După Bosmann

(1971) ar putea fi un dispozitiv endogen pentru amplificarea genică. Hahn (1973) consideră că la organismele superioare anumite structuri ale ADN ar putea fi transcrise prin mecanisme convenționale la ARN și de la acesta, prin transcriere inversă, ar fi reintegrate în ADN, dînd naștere secvențelor repetate. Descoperirea acestui mecanism a permis utilizarea lui în ingineria genelor, pentru transcrierea ARNm la ADN și a deschis orizonturi noi din punct de vedere experimental și conceptual.

Crick (1970) consideră că descoperirea transcripazelor inverse nu infirmă dogma centrală a biologiei moleculare, decît în măsura în care punctul său de vedere *, care preconizează încă o idee fundamentală, este greșit înțeles. Bazat pe cunoștințele actuale de biologie moleculară propune regruparea celor 9 modalități de transfer posibile (fig. 264) în trei grupe :

1) *Transfer general*, prezent în toate celulele : $\text{ADN} \rightarrow \text{ADN}$; $\text{ADN} \rightarrow \text{ARN}$; $\text{ARN} \rightarrow \text{proteine}$;

2) *Transfer special*, absent la cele mai multe celule ; poate apărea în circumstanțe speciale : $\text{ARN} \rightarrow \text{ARN}$ și $\text{ARN} \rightarrow \text{ADN}$, posibile în celulele infectate cu anumite virusuri. Transferul $\text{ADN} \rightarrow \text{proteine}$, postulat de Gamow a fost evidențiat numai în sisteme aceluare de tip special, în prezența neomicinei. După Crick, acest transfer ar putea funcționa cu artificii de tehnică specială, în prezența neomicinei și în celulele bacteriene intacte.

3) *Transfer necunoscut*, care după dogmă nu poate apărea niciodată : $\text{proteină} \rightarrow \text{proteină}$; $\text{proteină} \rightarrow \text{ADN}$; $\text{proteină} \rightarrow \text{ARN}$.

Pe aceste considerente, Crick apreciază că dogma centrală este la fel de importantă astăzi, ca și în momentul cînd a fost formulată. „Întreaga bază intelectuală a biologiei moleculare ar fi zdruncinată numai atunci

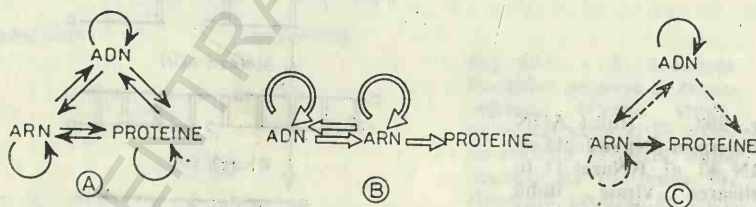


Fig. 264. — Circulația informației genetice în celulă. A. Direcția săgeților indică toate tipurile de transfer posibile între cele 3 categorii de polimeri. B. Tipurile de transfer demonstrate. C. Încercare de clasificare a modalităților de transfer după Crick (1970) : a, săgețile continue — transfer general ; b, săgețile întrerupte — transfer special ($\text{ADN} \rightarrow \text{proteine}$, numai *in vitro*) ; c, cele trei săgeți absente în raport cu A se referă la modalități de transfer nedetectate, specificate ca atare prin „dogma centrală”.

cînd se va demonstra că o singură celulă normală (neinfectată cu virusuri) utilizează ARN ca material genetic în loc de ADN, că folosește ADN m.c. în loc de ARNm sau, mai ales, dacă ar face măcar unul din cele trei transferuri considerate ca imposibile” (Crick, 1970).

* „Odată ce „informația” a trecut într-o proteină, nu se mai poate întoarce înapoi. Mai în detaliu, transferul de informație de la acid nucleic la acid nucleic sau de la acid nucleic la proteină poate fi posibil, dar transferul de la proteină la proteină sau de la proteină la acid nucleic este imposibil. „Informație” înseamnă, în acest caz, *determinarea precisă*, fie a „secvenței bazelor în acizii nucleici, fie a aminoacizilor în proteine” (Crick, 1958, 1970).

Colinearitatea genei și a produsului său proteic.

Dogma colinearității

„Ideea că un segment de ADN reprezintă o singură genă sau este exprimată colinear, ca o proteină, a fost profund zdruncinată”

M. G. ALLISON

În conformitate cu ipoteza lui Crick (1958, 1962), informația genetică codificată sub forma unei secvențe lineare de nucleotide în moleculele de ADN specifică, adică determină în mod direct, secvența lineară a aminoacizilor în moleculele de proteine. Această relație sugerează existența unei colinearități, adică a unei corespondențe lineare între fiecare unitate de codificare sau codon și aminoacidul pe care îl specifică, respectiv între fiecare genă și proteina corespunzătoare. Ipoteza asupra codului genetic formulată de Crick (1962) sugerează, de asemenea, că alterări mutaționale localizate ale secvenței nucleotidice a unei gene determină, cu necesitate, alterări localizate, corespunzătoare ale secvenței de aminoacizi din proteina codificată de gena respectivă. Este, deci, posibil să se demonstreze relația de colinearitate genă-proteină, comparându-se localizarea mutațiilor punctiforme pe harta genetică a genei respective, cu poziția în lanțul polipeptidic a aminoacizilor substituiți celor normali, în cazul fiecărei mutații.

Yanofsky (1967) a studiat această corespondență utilizând proteina A din structura triptofan sintetazei și gena respectivă de la *E. coli*. Complexul enzimatic activ al triptofan sintetazei catalizează ultima etapă a sintezei acestui aminoacid, conversia indol-3-glicerol fosfatului și a serinei la triptofan și aldehydă 3-fosfoglicerică. El este alcătuit din două polipeptide de tip α (proteina A, ~ 29 000 dal), codificate de gena A și de două polipeptide de tip β (~ 50 000 dal) codificate de gena B. Yanofsky a izolat un număr mare de tulpini cu mutații la nivelul genei A, care includeau substituirii de baze, mutații prin modificarea cadrului de citire, deleții de diferite mărimi etc. Deosebit de utile s-au dovedit mutațiile punctiforme. Comparând harta genetică fină a genei A cu secvența aminoacizilor în proteina A, a demonstrat că ordinea și localizarea mutațiilor în gena A sînt identice cu ordinea și localizarea aminoacizilor substituiți în proteina A (fig. 265), a cărei sinteză este controlată de această genă. Cum ambele structuri — gena și proteina — sînt lineare, modificările lor sînt colineare sau exact corelate, în sensul că înlocuirea unor aminoacizi în proteină se face într-o ordine care coincide exact cu aceea a locurilor alterate prin mutație în gena corespunzătoare. Experimentele lui Yanofsky care demonstrează relația dintre structura genelor și a proteinelor formate sub controlul lor au confirmat ipoteza lui Crick asupra codului genetic, pe baza a trei argumente esențiale: 1) fiecare aminoacid din lanțul polipeptidic este codificat de o anumită regiune specifică a genei; b) o anumită sec-

vență a unităților de codificare (codoni) din molecula de ADN specifică, în mod necesar, o secvență corespunzătoare a aminoacizilor în molecula de proteină; e) substituția prin mutație a unei secvențe din molecula de ADN antrenează obligatoriu substituția unui aminoacid din lanțul polipeptidic, și anume într-o regiune a polipeptidului care corespunde sediului mutației de pe gena determinantă.

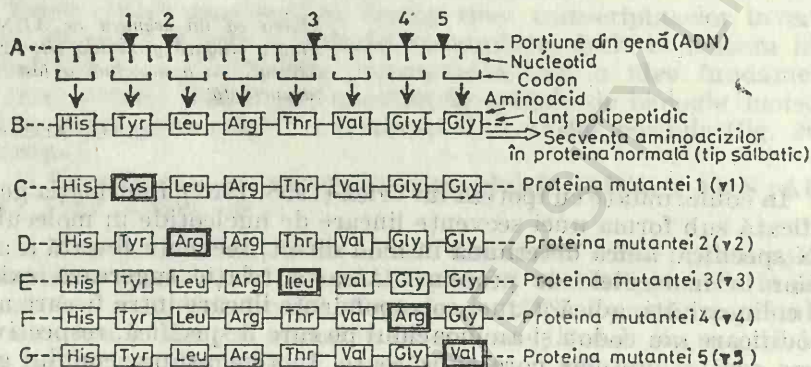


Fig. 265. — Reprezentarea schematică a experiențelor care au demonstrat structura colineară a genelor și a produsului lor proteic: A, B. Secvența bazelor în molecula normală de ADN și respectiv secvența aminoacizilor în polipeptidul codificat de ea. C, D, E, F, G. Secvențe polipeptidice modificate prin apariția unor aminoacizi neobișnuiți, în poziții corespunzătoare codonilor modificați prin mutație.

Colinearitatea genei cu produsul său proteic a fost confirmată și de Brenner (1969), care a studiat proteinele anormale ale capului fagului T4 de la *E. coli*, rezultate în urma apariției unor mutații nonsense ce determină oprirea prematură a sintezei unei polipeptide. El a demonstrat că polipeptidele formate, foarte eterogene, au o lungime perfect corelată cu poziția codonilor-stop în gena care le codifică.

În sfârșit, Sanger (1976), determinând secvența celor 5 375 de baze în ADN la fagul ΦX174, a confirmat același principiu: succesiunea codonilor în genomul ADN corespunde exact celei a aminoacizilor în diferitele proteine codificate. Aceste date au făcut ca, sub impulsul altor fenomene similare, să se acorde colinearității genei cu produsul său caracter de universalitate, sub denumirea de dogma colinearității.

„Genele suprapuse”

„ADN din cromosomul sagului $\Phi X174$
este utilizat cu o eficiență uimitoare”

A. KORNBERG

Una dintre primele dogme ale geneticii contemporane („o genă — o proteină”) a fost stabilită de Beadle și Tatum (1945), cu ocazia studiilor de mutageneză indusă cu radiații ultraviolete la *Neurospora crassa*. Spre deosebire de tipul sălbatic inițial, tulpinile mutante nu se mai puteau dezvolta pe medii sintetice cu compoziție simplă, decît în prezența unui factor de creștere esențial, din categoria aminoacizilor, vitaminelor, bazelor purinice sau pirimidinice. Peste 95 % dintre mutantele astfel obținute aveau un defect de metabolism, care le priva de capacitatea de a sintetiza un anumit factor de creștere sau de a-l produce în cantitățile necesare, pornind de la componentele simple ale mediului. Studiul activității enzimatice a acestor mutante a arătat că, de cele mai multe ori, ele nu mai dispuneau de o anumită enzimă, fiindcă își pierduseră capacitatea de a o sintetiza, o elaborau în cantități insuficiente sau, în sfîrșit, sintetizau în locul ei o enzimă modificată, puțin activă sau ușor inactivabilă. Această deficiență enzimatică explica pierderea capacității de sinteză a factorului de creștere care, de aceea, trebuia adăugat în mediul de cultură minimal. S-a demonstrat astfel că de fiecare genă depinde în mod direct o reacție biochimică specifică sau, după formularea lui Beadle și Tatum, „o genă → o enzimă” sau „o genă → o proteină”. Pe baza acestor date, conceptul „o genă → o enzimă și relația dintre mutația genică și activitatea enzimatică au fost unanim acceptate.

Studiile ulterioare au confirmat că, spre exemplu, în cazul enzimei triptofan sintetaza la *N. crassa* relația o genă → o enzimă este directă: enzima este alcătuită dintr-un singur polipeptid, a cărui sinteză este controlată de o singură genă. La *E. coli* însă, biosinteza aceleiași enzime este codificată de două gene diferite. Enzima este formată din două lanțuri polipeptidice (α și β) diferite, care, după ce sînt sintetizate separat, se asamblează, pentru a forma triptofan sintetaza, cu formula $2\alpha 2\beta$, esențială în etapa finală a biosintezei triptofanului. Relația „o genă → o enzimă” a evoluat în sensul „o genă → un polipeptid” (fig. 266).

Descoperirea genelor „suprapuse”

Descifrarea codului genetic și determinarea secvenței nucleotidelor și aminoacizilor au făcut posibilă stabilirea unor corespondențe între moleculele de ADN și proteine, ducînd la o serie de rezultate neașteptate. Între altele, în cazul sagului $\Phi X174$ s-a constatat existența unei discrepanțe între lungimea reală a genomului ADN și cantitatea de informație

genetică, teoretic necesară pentru a codifica sinteza tuturor proteinelor fagice.

Fagul $\Phi X174$, care infectează anumite tulpini de *E. coli*, are aspectul unui mic icozadru, cu diametrul de 25 nm (masa moleculară $\sim 6,2$ Mdal), prevăzut la fiecare din cele 12 vertexuri cu spicule necesare pentru a se adsorbi pe receptorii de pe suprafața celulei bacteriene, înainte de infecție (fig. 267). Este alcătuit din 11 proteine, denumite A, A', B, C, D, E, F, G, H, J și K. *Capsida* este formată din 60 de molecule de proteină F (proteina majoră a capsidei), iar spiculele conțin, fiecare, 5 molecule de proteină G (proteina majoră a spiculelor) și o moleculă de proteină H (proteina minoră a spiculelor), cu rol de proteină „pilot”. În interiorul capsidei sunt localizate 30–50 molecule de proteină J, o moleculă de proteină A⁺ (reprezentând capătul carboxiterminal al proteinei A) și două tipuri de poliamine (spermidina și putrescina). Proteina J, avînd rol în condensarea ADN în capsidă, este alcătuită din 37 aminoacizi, dintre care 12 sînt reprezentați de lizină și arginină). *Genomul* este format dintr-o moleculă de ADN monocatenar, circular, cu masa moleculară de

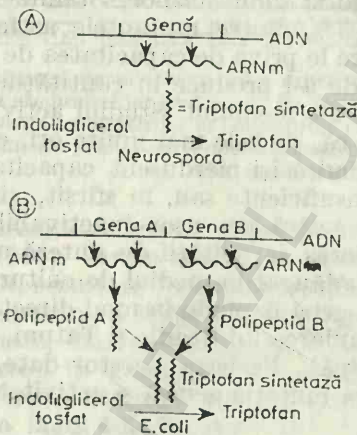
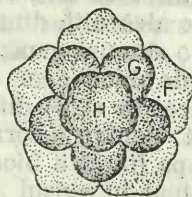
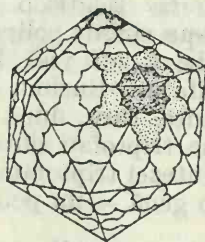


Fig. 266. — Conceptul o genă — un polipeptid. A. La *Neurospora*, enzima triptofan sintetază este formată dintr-un singur polipeptid codificat de o genă. B. La *E. coli*, enzima este alcătuită din două polipeptide, fiecare codificată de o genă separată. Ambele exemple ilustrează relația o genă — un polipeptid și funcția fiecărei gene structurale.

Fig. 267. — Reprezentarea schematică a structurii fagului $\Phi X174$, cu aranjarea subunităților (A), B. Schema mărită a unei regiuni a spiculelor, evidențiind orientarea proteinelor produse de genele H, G și F (după Edgell și colab., 1969).



A

B

$\sim 1,7 \times 10^6$ dal, conținînd 5 386 de nucleotide, a căror secvență a fost complet determinată (Sanger, 1978). Într-o primă etapă, după identificarea tuturor proteinelor virale și determinarea masei lor moleculare, s-a constatat că

genomul fagului $\Phi X174$ conține o cantitate de informație genetică (5 386 de nucleotide) inferioară celei teoretic necesară ($\sim 6\,100$ de nucleotide), pentru a codifica sinteza lor (tabelul nr. 36).

Tabelul nr. 36

Capacitatea de codificare a genelor fagului $\Phi X174$ și funcțiile lor

Gena	Funcția	Greutatea moleculară a proteinelor (dal)*	Numărul nucleotidelor		G.m.a proteinelor estimată după secvența informației**
			estimat după g.m. a proteinei	estimat după secvența nucleotidelor	
A	Sinteza ADN dublu catenar (F1)	62 000	1 701		
A'	Blocarea sintezei ADN propriu celulei-gazdă	35 000	(960)	> 1851	67 400
B	Morfogeneza capsidei	19 000—25 000	> 522		
C	Maturarea ADN	7 000	192		
D	Morfogeneza capsidei	14 500	349	456	16 811***
E	Liza celulei-gazdă	10 000—17 500	> 273	(273)	9 940
F	Proteina majoră a capsidei	45 000	1317	1 287	46 700
G	Proteina majoră a spiculelor	19 000	522	525	19 053***
H	Proteina minoră a spiculelor; adsorbție	37 000	1014	981	35 500
J	Proteina corpusecului central; condensarea ADN	5 000	138	114	4 097***
Total lungimea ADN $\Phi X174$			> 6 078	5 374****	

* Datorită diferențelor mari de greutate moleculară a proteinelor codificate de fagul $\Phi X174$, au fost menționate valorile citate cel mai frecvent sau din lucrările cele mai recente.

** Greutatea moleculară a proteinelor a fost calculată pe baza numărului nucleotidelor, utilizând formula: greutatea moleculară a proteinelor = nr. nucleotidelor/($3 \times 0,00915$).

*** Valorile au fost calculate pe baza secvenței aminoacizilor.

**** Cifra include cele 160 de nucleotide determinate în regiunea intercistronică.

Întrucit aceste observații contraveneau conceptului de bază „o genă — un polipeptid” și respectiv raportului de codificare o tripletă de nucleotide — un aminoacid, acest fenomen a fost pus pe seama unor imprecizii în determinarea greutății moleculare a proteinelor virale. Ulterior, Sanger și Coulson (1977) au explicat dificultățile de localizare a poziției genelor *D* și *E* pe harta genetică a fagului, prin faptul că genele respective sînt localizate în același segment al ADN fagic. Datorită acestui fenomen, aceeași secvență nucleotidică conține informație genetică pentru două proteine și anume, informația care codifică proteina *E* este integral cuprinsă în cea care codifică proteina *D*, reprezentînd $\sim 60\%$ din aceasta. Această situație neobișnuită a fost explicată de Barrel, Air și Hutchinson III (1977), care au demonstrat că, în acest caz, aceeași secvență nucleotidică poate fi citită în două modalități diferite și poate duce la sinteza a două proteine diferite. În cazul genei pentru proteina *E*, citirea se face cu o decalare de un singur nucleotid în ordinea tripletelor-codon, în așa fel încît prima literă a unui codon pentru proteina *D* devine ultima literă a unui codon pentru proteina *E*. Analiza modului de citire a informației dintr-un polimer sintetic omogen alcătuit din triplete de T, A și C permite

înțelegerea acestui proces. Acest polimer poate fi citit în primul caz (corespunzând proteinei D) în succesiunea normală :

GAC GAC GAC GAC GAC, care corespunde polipeptidului polileucină,

iar în condițiile amintite pentru proteina E (cu decalare de un nucleotid), în succesiunea :

GACGACGACGACGAC, care corespunde unui polipeptid de tipul policisteină.

Aceste rezultate, care nu pun în discuție principiul codului genetic nesuprapus, ci modul în care poate fi folosit, demonstrează posibilitatea unor variații în cadrul de citire a mesajului genetic și infirmă postulatul „o genă — un polipeptid”. Conform acestor observații, gena nu reprezintă un segment determinat din molecula de ADN, ci o anumită secvență nucleotidică particulară. În timp ce la bacterii, o genă corespunde unui polipeptid, cu o lungime și ordine de succesiune determinată a aminoacizilor (în funcție de colinearitatea genei și a produsului său), în cazul fagului ΦX174, informația din aceeași „genă” poate fi citită în mod diferit, în funcție de circumstanțe. Fenomenul a fost descris sub denumirea de „gene suprapuse” sau de „genă în genă” („gene within a gene”).

Cercetările ulterioare au demonstrat că fenomenul genelor „suprapuse” se repetă de mai multe ori în structura genomului ΦX174, care are următoarele particularități :

1) Regiunea descrisă inițial ca gena A conține în structura sa întreaga genă B, citită însă într-un cadru de lectură („reading-frame”) diferit (fig. 268).

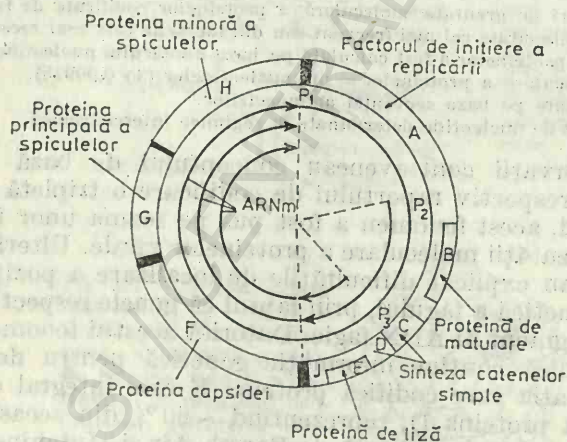


Fig. 268. — Harta genetică a fagului ΦX174, indicând lungimea, pozițiile celor două gene și funcția lor, precum și pozițiile celor trei situsuri promotor (P_1 , P_2 , P_3), ale celor două situsuri terminus și ale genelor „suprapuse”.

2) O genă mică, denumită A^* sau A' , formează proteina A^* prin reinițierea traducerii informației genetice de la un alt situs promotor, situat în mijlocul genei A, citită în același cadru de lectură.

3) Cistronul K, descris de Shaw și colab. (1978), suprapus parțial genelor A și C, este tradus începând de la nivelul de suprapunere a doi codoni terminali ai cistronului B, continuă 86 de baze în cistronul A și

primele 86 de baze din codonul C. El este „citit” într-un alt doilea cadru de lectură la capătul genei A și începutul genei C și chiar într-un al treilea cadru de citire posibil, pentru cinci nucleotide în regiunea în care genele A și C sînt adiacente.

4) Gena E este inclusă în gena D.

5) În genomul $\Phi X174$ au fost identificate trei situsuri promotor (de legare a ARN polimerazei), notate $P_A^{(P1)}$, $P_B^{(P2)}$ și $P_D^{(P3)}$.

6) Genomul $\Phi X174$ conține numai trei regiuni intercistronice distincte, care nu sînt traduse. Ele corespund „spațiilor” intercalate între genele H și A, J și F, E și G, avînd 66, 39 și respectiv 111 nucleotide. La nivelul lor, secvențele nucleotidelor prezintă regiuni de complementaritate, care permit ca molecula să se plieze, formînd perechile de baze intracatenare, cu forma unor bucle „în ac de păr” („hairpin”). După Fiddes (1977), prezența acestor structuri în regiunile care nu codifică le-ar permite să exercite unele funcții de reglare. Astfel, „spațiul” HA conține promotorul genei A (P_A sau P_1) și un situs puternic (major), în care procesul de transcriere este stopat („terminator site”). Spațiul J—F îndeplinește funcția de situs mai slab (minor), cu funcția de terminare a transcrierii genetice, în timp ce funcția spațiului F—G este încă nedeterminată. Genele F, G și H, care codifică proteine structurale, situate înaintea situsului „terminator” sînt în ansamblu, mai frecvent transcrise și traduse decît genele A, B, D, E și J, care sînt implicate în procesul de replicare. Această particularitate funcționează ca un mecanism de reglare a exprimării genelor, mai puțin subtil decît cel descris la fagii mari, dar suficient pentru a asigura sinteza preferențială a proteinelor structurale ale virionului. Unele secvențe de reglare sînt situate în afara regiunilor netraduse al genomului. Astfel, promotorii $P_B(P_2)$ și $P_D(P_3)$ sînt situați în regiuni cu rol de codificare. Ei conțin secvențe care funcționează ca situsuri de recunoaștere pentru ARN polimerază, deși segmentul de ADN în care se găsește codifică legarea anumitor aminoacizi în lanțul polipeptidic. De menționat că în porțiunea de genom cuprinsă între începutul genei A și sfîrșitul genei J (care reprezintă ~40% din genom) nu există nici o regiune intercalată netradusă. Proteinele sintetizate de cistronii inclavați nu seamănă cu cele produse de cistronii mai mari în care sînt cuprinși, deoarece ARN-in transcris într-un alt cadru de lectură (fig. 269).

Analiza genetică fină a permis și evidențierea altor modalități de economie de informație genetică la fagul $\Phi X174$ (Sanger și colab., 1977; Fiddes, 1977), legate de faptul că unele secvențe ale genelor „suprapuse” au, în același timp, funcție de codificare pentru proteine structurale și funcție de reglare. Astfel, situsurile promotor $P_B(P_2)$ și $P_C(P_3)$ sînt situate în interiorul genelor A și respectiv C. Ceva mai mult, a fost descrisă o situație, în care aceeași secvență nucleotidică (AAGGAG) îndeplinește trei funcții diferite: în cadrul de lectură normal reprezintă situsul de recunoaștere ribosomal pentru sinteza proteinei J, în alte două cadre de lectură diferite, codifică aminoacizii care intră în structura proteinelor D și E (fig. 269).

Semnificația biologică a genelor „suprapuse”. Pornind de la premisa că dimensiunea genomului virusurilor foarte mici ar fi limitată de mărimea fizică a capsidei, Barrel, Air și Hutchinson III (1976) consideră că, în

cazul celor cu genom ADN monocatenar, singura modalitate de a face economie de informație genetică este aceea a „genelor suprapuse”. În cazul genomurilor formate din ADN d.h. se poate adăuga posibilitatea utilizării informației genetice de pe ambele catene.

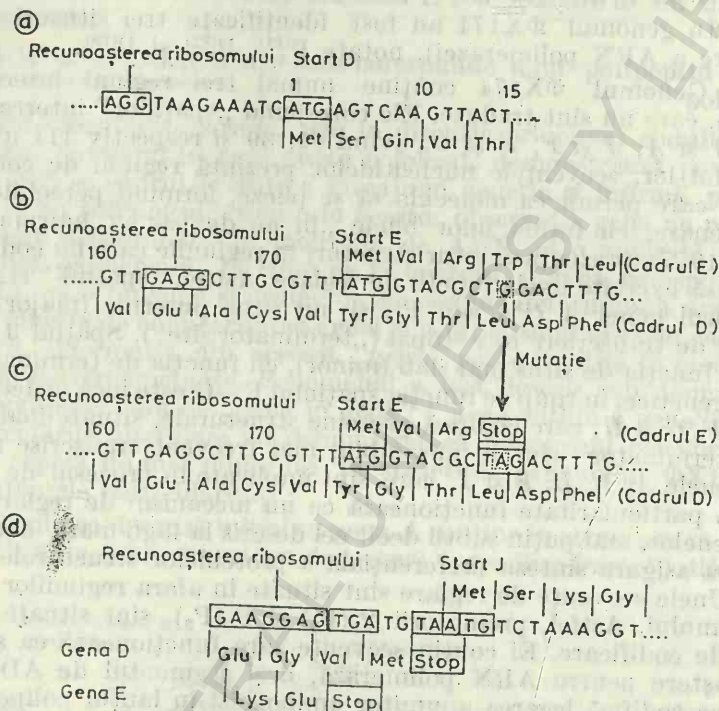


Fig. 269. — Economia de ADN la fagul $\Phi X174$, prin suprapunerea genelor. **a.** Traducerea genei *D* este inițiată la nivelul codonului ATG, care urmează semnalului de recunoaștere ribosomal. **b.** Începutul genei *E* este marcat de prezența unui alt situs de legare ribosomal și altui codon inițiator, situați în mijlocul genei *D*, în alt cadru de citire. **c.** Cadrul de citire a genei *E* a fost identificat prin descoperirea mutației de la G la A, la un situs mutant la care codonul TGG (*trp*) este înlocuit cu TAG (codon-stop), care blochează prematur traducerea genei *E*. Cadrul de citire a genei *D* nu este afectat, deoarece atât CTG, cit și CTA specifică același aminoacid, leucina. **d.** Figura prezintă sfârșitul genelor „suprapuse” *D* și *E* și începutul genei *J*. Această secvență nucleotidică servește trei funcții: GAAGGAG este situsul de recunoaștere ribosomal pentru începutul genei *J* și codifică, în cadre de citire diferite, aminoacizi din structura genelor *D* și *E*. Codonul terminal al genei *D* este suprapus, codonului inițiator al genei *J*, care este citit într-un cadru de citire diferit (după Fiddes, 1977).

Posibilitatea suprapunerii genelor în diferite cadre de lectură a fost dezaprobată pe considerente de ordin teoretic, deoarece impune importante constrângeri evolutive. În aceste cazuri, o mutație favorabilă într-un anumit cadru poate fi defavorabilă în cel de-al doilea, introducând, spre exemplu, un codon-stop prematur, care oprește sinteza celei de-a doua proteine. Existența genelor „suprapuse” impune o evoluție paralelă a lor, singurele modificări nucleotidice îngăduite fiind cele care permit ca în ambele cadre de lectură — mesajul genetic să codifice o proteină activă.

Fiddes (1977), ca și Barrel, Air și Hutchinson III (1977, 1978) au făcut unele considerații ipotetice privind originea și ordinea de apariție a genelor suprapuse bazate pe structura codonilor din secvența genomului ΦX174. Codonii genei *D* conțin o mare proporție (~40%) de resturi de timină (T), în poziția a 3-a, în comparație cu alte regiuni ale genomului. Este probabil că această genă a apărut prima și că strămoșii fagului ΦX174 ar fi putut „supraviețui” în mediul natural fără o genă specifică pentru a produce liza celulei bacteriene-gazdă. În momentul în care un eveniment mutațional a determinat inițierea sintezei unei proteine, prin deplasarea cadrului de lectură cu un nucleotid mai la dreapta cadrului de citire a genei *D* (cum se întâmplă în cazul genei *E*), a apărut un număr mare de codoni cu T în poziția a doua. După cum este cunoscut (vezi capitolul „Codul genetic”), codonii cu un nivel ridicat de T în poziția a doua specifică, în general, aminoacizi hidrofobi. Ca urmare, proteina, produs al genei *E*, va avea o funcție globală similară celei a unei molecule de detergent. O astfel de structură ar putea explica funcția proteinei *E*, de liză a celulei-gazdă, prin alterarea structurii membranei externe a peretelui celular. Pe baza acestor date, se poate presupune că gena *E* a apărut în timp, după gena *D*, ca rezultat al unei mutații cu funcție înalt adaptativă, care a permis virusului să valorifice conținutul său bogat în T preexistent, pentru a distruge bacteriile infectate.

Problemele ridicate de suprapunerea genelor *A* și *B* sînt mai speciale, deoarece produșii lor au o activitate enzimatică, ceea ce implică o structură mai precisă, respectiv constrîngerii mult mai puternice asupra secvenței aminoacizilor. Analizînd și în acest caz natura codonilor, se constată că în regiunea din gena *A*, care precede suprapunerea, incidența ridicată a codonilor cu T în poziția a treia, caracterizează cadrul de lectură a genei *A*. În regiunea în care genele *A* și *B* sînt suprapuse, incidența ridicată a codonilor cu T în poziția a treia devine o particularitate a genei *B*.

Pornind de la premisa că nivelul ridicat al codonilor cu T în poziția a treia reprezintă o caracteristică a fagului ΦX174, Fiddes (1977) consideră că genele *A* și *B* au fost inițial separate și că gena *A* se termină înainte ca să înceapă gena *B*. În momentul în care o mutație în gena *A*, la nivelul codonului-stop, i-a anulat acestuia funcția specifică, a devenit posibilă citirea informației în continuare, de-a lungul genei *B*.

Datele menționate demonstrează un mecanism complex de economie de informație genetică: pe de o parte, prin existența unor gene care se suprapun, iar, pe de altă, prin capacitatea unui singur segment de ADN de a avea o funcție codificatoare pentru un produs proteic și o funcție de reglare. Semnificația biologică a acestui fenomen este diferit apreciată. Unii cercetători consideră că mecanismul descris permite înțelegerea modului în care virusurile au putut evolua rapid și cu o mare economie de mijloace. Cu aceeași informație genetică, inclusă într-un spațiu foarte restrîns, virusurile au putut dobîndi avantaje selective în cursul evoluției, avînd posibilitatea de a iniția a doua „citire” a aceluiași mesaj genetic, într-un alt „cadru de lectură”, și de a induce sinteza unei a doua proteine, utilă pentru menținerea sa în natură. După alți autori însă, acest sistem este, din contră, foarte surprinzător din punct de vedere evolutiv, deoarece impune constrîngerii puternice, determinate de faptul că orice

mutație în segmentul genetic comun afectează secvența aminoacizilor în ambele proteine. În felul acesta, economia de material genetic nu este un avantaj, ci reflectă natura unui sistem destul de primitiv. Nu se cunoaște, de asemenea, dacă acest fenomen este răspândit, sau nu. El este, probabil, o particularitate a virusurilor mici, pentru care ar reprezenta singura cale de a dobîndi funcții noi. La organisme, situația este exact inversă, atît în ceea ce privește capacitatea de codificare a compușilor proteici structurali, cît și cea de reglare. Ca urmare, atît la procariote, cît și la eucariote, existența genelor „suprapuse” nu este necesară, o dovadă fiind existența a numeroase redundanțe ale informației genetice, mărturie a unui trecut evolutiv complicat (Fiddes, 1977).

Genele cu structură discontinuă

(Pl. 30)

... „Am folosit în mod deliberat cuvântul „genă” într-un sens vag, deoarece, în acest moment orice definiție precisă ar fi prematură”...

F. H. C. Crick, 1979

Progresele tehnicilor de analiză a structurii și funcției genelor au făcut posibil studiul comparativ al mărimii și secvenței bazelor unei serii largi de molecule de ADN de proveniență virală sau eucariotă și în moleculele de ARNm corespunzătoare. Cu această ocazie, s-a făcut constatarea surprinzătoare a unei lipse evidente de concordanță atât între lungimile celor două tipuri de molecule, cât și în secvența nucleotidelor din structura lor. S-a emis ipoteza că, în aceste cazuri, ARNm nu mai este copia fidelă a unui segment continuu din ADN, deoarece porțiuni întinse din acesta „dispar” sau sint „omise” atunci când se face transcrierea de la ADN la ARNm (Berget și colab., 1977). Fenomenul a fost descris inițial la adenovirusul uman tip 2 (Ad H₂), la care s-a demonstrat că molecula de ADN, corespunzând unei anumite gene, este mult mai lungă decât cea de ARNm corespunzător (Berget și Sharp, 1977). O situație similară a fost evidențiată la virusul SV40 (Bereș și Sharp, 1978), la gena pentru ovalbumină aviară (găină) (Chambon, 1978), ca și la genele pentru Ig și hemoglobină (Tonegawa și colab., 1978). Studiul comparativ al fragmentelor de restricție obținute prin clivarea ADN cromosomal și al celor de ADNc (ADN copie-complementar), sintetizat de transcriptaza inversă după o matriță de ARNm, a scos în evidență aceeași deosebire esențială.

S-a ajuns la concluzia că foarte multe, probabil majoritatea genelor din celulele eucariote și din genomul virusurilor lor, au o structură discontinuă, în sensul că secvențele de baze cu rol în codificare („coding sequences”), de la care se formează ARNm și proteinele sint „fragmentate”, „întrerupte”, datorită intercalării unor secvențe de ADN „nonsens” sau „tăcute”. Secvențele de baze cu rol evident în codificare din structura ADN care au corespondență în ARNm au fost numite *exoni*, deoarece părăsesc nucleul și „ies” în citoplasmă, unde sint traduse în polipeptide (Gilbert, 1978). Secvențele intragenice intermediare, fără rol aparent în codificare, îndepărtate din ARNm, au fost numite *secvențe intercalate* („intervening sequences”, Tilgham, 1978) sau *introni* (Tonegawa, Maxham și Gilbert, 1978). Genele celulelor eucariote și ale virusurilor lor, având acest tip de structură au fost numite gene clivate („Split genes”, „broken down genes”), gene în bucăți („gènes en morceaux”), gene fragmentate („gènes morcelés”) sau gene „în mozaic” deoarece secvențele exonice (codificatoare) sint incluse într-o matrice de ADN „tăcut”, matricea intronică aparent fără rol informațional. Ele se deosebesc fundamental de genele celulelor procariote în care informația genetică este înscrisă într-o

formă continuă, neîntreruptă, de secvențe intercalate prin acest caracter particular de alternanță între exoni și introni, care conferă genelor de tip eucariot structura caracteristică discontinuă.

Evidențierea acestui tip de structură s-a făcut, în special, pe două căi: 1) prin detectarea unor molecule de ARN precursor cu greutate mole-

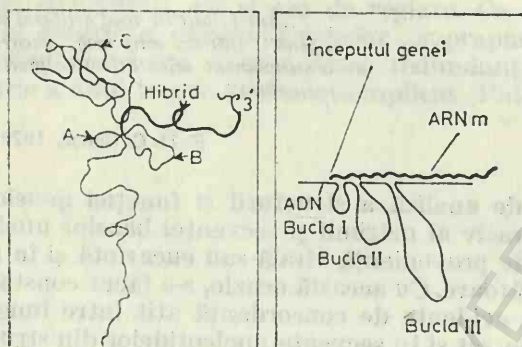


Fig. 270. — Evidențierea genelor cu structură discontinuă. Reprezentare schematică bazată pe microelectronografia unei gene de la *Adenovirus* după hibridare cu ARNm corespunzător. Regiunile nehibridate formează bucle m.c., demonstrând că ARNm este mai scurt decât molecula de ADN după care a fost transcris. Buclele respective A, B și C (respectiv I, II și III din diagrama teoretică) corespund intronilor eliminați din ARNm (după Sharp, 1977).

culară mai mare decât cea a ARNm matur și 2) prin examenul microelectronografic al moleculelor heteroduplex rezultate din hibridarea ADN corespunzător genei respective cu ARNm matur purtător al mesajului genetic la ribosomi. În acest tip de heteroduplex, în timp ce regiunile complementare apar dublu catenare, datorită formării de perechi între baze, regiunile corespunzătoare intronilor formează bucle monocatenare. Mărimea și localizarea lor exactă pot fi stabilite prin tratarea heteroduplexului cu nucleaza S1, care elimină specific bazele neîmperecheate, lăsând intacte regiunile dublu catenare (fig. 270).

Exprimarea genelor „divizate” în celula eucariotă

„Ex pluribus unum, ex uno plura”

Structura genetică particulară a genelor eucariote a sugerat o modalitate de funcționare adecvată, corespunzând, într-o primă fază, unei transcrierii „primare” continuă și colineară a ADN (incluzând atât intronii, cât și exonii) de către ARN polimerază. Rezultă o moleculă mare de ARNm precursor sau ARN premesager (ARN pre-m). Ulterior, intronii sunt excizați, iar exonii adiacenți sunt legați „cap la cap” pentru a forma ARNm matur.

Mecanismul molecular de formare a unei singure molecule de ARNm funcțional prin îndepărtarea intronilor din produsul primar al transcrierii genetice a fost denumit cu un termen popular „înnădire” (Crick, 1979) (engl. „splicing”; fr. „épissage”), deși acest termen nu reflectă nici complexitatea și nici exactitatea cu care s-a realizat. El a fost descris ca tipic în cazul genei pentru ovalbumină de la găină, care are 7 700 pb, și conține

8 exoni (notați cu litera L și cifrele 1—7) și 7 introni (notați de la A la G).

Produsul primar al transcrierii, ARN pre-m, suferă un proces de poliadenilare 3' terminală, în timp ce extremitatea sa 5' este acoperită („capped”) prin legarea unei secvențe *cap* (engl. „cap”; fr. „coiffe”), metil-7-Gppp metil A/G. Ulterior, secvențele intronice sînt excizate, în timp ce exonii adiacenți sînt reușiți unul în continuitatea celuilalt. În cazul

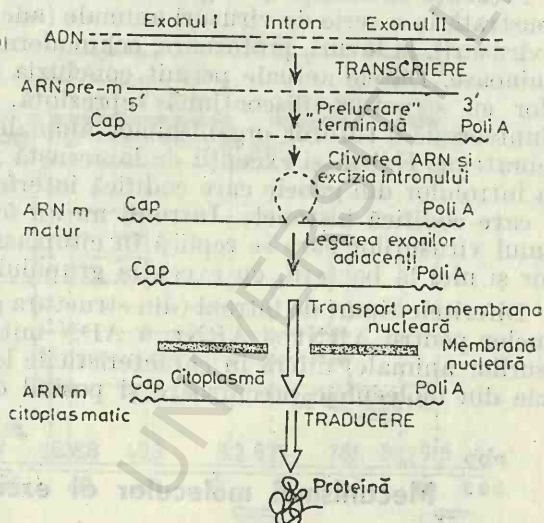


Fig. 271. — Reprezentarea schematică a procesului de prelucrare a produsului rezultat din transcrierea primară a unei gene (ARN pre-mesager), care conține un singur intron (după Knowles, 1982).

genelor cu introni multipli, procesul decurge treptat, fiecare etapă producând un intermediar cu lungime progresiv mai mică, fapt care explică prezența în nucleu a unor molecule de ARNm cu lungimi diferite. În final, ARNm este transferat prin membrana nucleară în citoplasmă (fig. 271).

Particularități structurale și răspîndirea intronilor

Intronii sînt reprezentați de secvențe nucleotidice cu lungimi variabile, în general mai mari decît exonii. Ei pot avea, după Chambon (1984), o lungime cuprinsă între 100 și 10 000 pb., chiar 20 000 pb. Ca urmare, genele vertebratelor au evoluat în așa fel încît pot fi de 10—30 de ori mai mari decît secvența codificatoare (Gilbert, 1985). Această particularitate explică faptul că la eucariote genele de 50 kb nu sînt rare, cea mai mare descrisă pînă în prezent avînd 200 kb.

După Danchin și Slonimski (1980), într-o genă cu dimensiuni medii, exonii reprezintă, în general, aproximativ 1 000 perechi de nucleotide, iar intronii între 5 000 și 20 000 perechi de nucleotide sau chiar mai mult. Astfel, gena pentru actină (proteina esențială pentru mobilitatea celulară), avînd 23 000 pb, conține un singur intron, gena pentru catena H a imunoglobulinei are 4 introni și 5 exoni, gena hemoglobinei, 3 exoni separați de 2 introni. Gena ovalbuminei de găină, avînd 7 564 pb, are 7 introni, care însumează 5 692 perechi de nucleotide și 8 exoni (1 872 nucleotide). În alte cazuri, numărul intronilor este și mai mare: 16, în gena care codi-

fică ovotransferina aviară, și 25 introni mari și 6—10 mici, în gena pentru vitelogenina aviară. În aceasta din urmă, secvențele codificatoare reprezintă 6 700 perechi de nucleotide, iar intronii, 16 300 perechi de nucleotide. Analiza datelor cunoscute permite concluzia că, în general, nu există limite de mărime și/sau de număr compatibile cu o anumită lungime a ARNm (Chambon, 1981).

Prezența intronilor și a genelor cu structură „fragmentată” a fost demonstrată la o serie de virusuri animale (adenovirusuri, SV40, polioma, retrovirusuri), la levuri, protozoare, echinoderme, insecte, ca și la plantele leguminoase. Datele actuale permit concluzia că prezența intronilor și a genelor cu structură discontinuă reprezintă, probabil, o caracteristică evasiuniversală a tuturor organismelor animale și în mod cert a tuturor vertebratelor. Există și excepții de la această regulă, reprezentate de absența intronilor din genele care codifică interferonii α și γ , precum și din gena care codifică histonele. Intronii nu au fost niciodată evidențiați în genomul virusurilor care se replică în citoplasmă (*Poxvirus*), al bacteriofagilor și nici la bacterii, cu excepția grupului *Archaeobacteria*.

Diferitele tipuri de introni (din structura genelor și a ARNm nuclear, a genelor pentru ARNt și ARNr, a ADN mitocondrial sau din genomul virusurilor animale) diferă în caracteristicile lor structurale, în modul de excizie din moleculele precursorare și posibil ca origine.

Mecanismul molecular al exciziei intronilor

Studiul funcționării genelor „divizate” a confirmat ipotezele inițiale, în sensul că sinteza proteinelor în celulele eucariote necesită o fază în plus, față de etapele descrise la bacterii, reprezentată de transcrierea genetică cu sinteza unei molecule de ARN premesager. „Maturarea” acestuia, respectiv excizia intronilor și restabilirea continuității informației genetice este — după datele de care dispunem în prezent — un proces biochimic subtil, care evoluează cu mare acuratețe. El implică, pe lângă recunoașterea riguroasă a extremităților intronilor, legarea exonilor cu respectarea cadrului de citire a informației genetice. Au fost descrise cinci mecanisme diferite de excizie și reunire a ADN.

Evoluția procesului de excizie la virusurile animale

Exemplul cel mai bine analizat este cel al adenovirusului uman tip 2 (AdH—2), al cărui genom, format din ADN d.c. (~35 000 pb), este terminat cu secvențe repetate invers, lungi de 103 nucleotide, notate în fig. 272 *abc* și respectiv *cba*. Transcrierea ADN este efectuată de ARN polimeraza II celulară. Genele tardive, reprezentind ~83% din informația genetică virală, formează un operon unic, cuprins între pozițiile 36 și 91,5 ale genomului. Transcrierea inițială la un promotor unic (situat în poziția 16,7) determină formarea unei molecule de ARNm precursor foarte mare, care conține informația regiunii „leader” (l_1 , l_2 , l_3) și informația „corpului” operonului, corespunzind genelor structurale. El este clivat la nivelul a 5 secvențe riguros definite, care ulterior sînt „recunoscute” de polimeraza celulară, ce le adaugă o „coadă” din resturi de adenozil (A)_n, realizînd

poliadenilarea 3' terminală. În felul acesta, se formează 5 tipuri de ARN pre-m corespunzând „domenilor corpului” genomului cu limitele: 1) 16,7—38,8; 2) 16,7—49,9; 3) 16,7—62; 4) 16,7—78,6 și 5) 16,7—91,5, terminate, toate, cu secvența poli-A. Aceste molecule de ARN pre-m sînt supuse unor procese succesive de clivare și legare, care duc la deleția regiunilor notate cu linii punctate orizontale (fig. 272), pentru a păstra numai regiunile marcate cu săgeți continue.

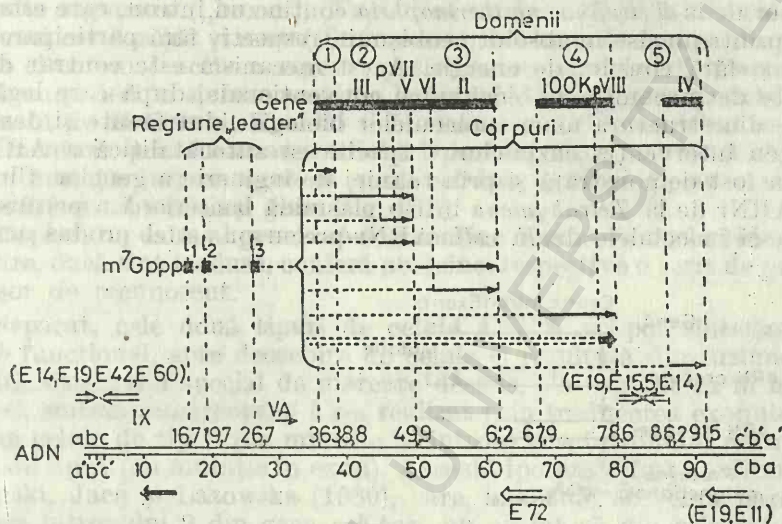


Fig. 272. — Principalele tipuri de ARNm formate prin transcrierea genelor tardive de la adenovirusul uman tip 2. Pentru simplificare sînt reprezentate numai 9, din cele 13 tipuri diferite de ARNm (după Girard și Hirth, 1980).

În urma acestui proces au fost identificate 13 tipuri diferite de molecule de ARNm tardiv, avînd fiecare o secvență *cap* (m⁷Gppp) la extremitatea 5'. Regiunea „leader” care urmează acestei secvențe, identică pentru toate tipurile de ARNm tardiv, derivă din cele 3 secvențe nucleotidice (1₁, 1₂, 1₃) situate în pozițiile 16,7; 19,7 și 26,7 ale genomului. Ea conține semnalele de recunoaștere și de legare de ribosomi (în special o secvență Shine—Dalgarno, lungă de 8 nucleotide). Moleculele de ARNm astfel formate codifică fiecare sinteza unei singure proteine, chiar dacă conțin informația corespunzătoare mai multor cistroni (Girard și Hirth, 1980).

Mecanismul exciziei intronilor în genele ARNt

După cum s-a demonstrat, unele gene care codifică ARNt la levuri, unii fungi filamentosi, alge și protozoare au structură discontinuă. Genele respective sînt, în general, mici (~80 de nucleotide) și conțin un singur intron mic (~15 nucleotide), situat în regiunea mediană. El este excizat *in vitro*, pe cale enzimatică, printr-un mecanism încă necunoscut (Abelson și colab., 1980). Exactitatea exciziei s-ar putea explica prin proprietatea generală a enzimelor de a recunoaște cu precizie anumite detalii de pe suprafața substratului și în particular anumite structuri tridimensionale care

il caracterizează. Or, după cum se știe, moleculele de ARNt au o structură tridimensională foarte caracteristică și o formă globală de bumerang sau de L. Moleculele de ARNt precursor au o buclă în plus, determinată de prezența intronului. Este probabil că enzimele de excizie — legate recunosc în mod specific această buclă și o elimină.

Mecanismul exciziei intronilor în genele ARNr*

Cech și colab. (1982) au arătat că dinții faptul că ARN ribosomal precursor de la *Tetrahymena thermophila* conține un intron, care este îndepărtat printr-un sistem absolut neobișnuit, respectiv fără participarea unei enzime și fără consum de energie. Acest mecanism este contrar datelor furnizate de mecanismele biochimice convenționale, după care legăturile chimice din structura macromoleculelor biologice sînt făcute și desfăcute numai cu intervenția enzimelor. Capacitatea autocatalitică a ARN-precursor a fost demonstrată și prin tehnici de inginerie a genelor. Clonarea genei ARNr de la *Tetrahymena* într-o plasmidă bacteriană a permis transcrierea ei în celulele de *E. coli*. ARNr-precursor astfel produs artificial

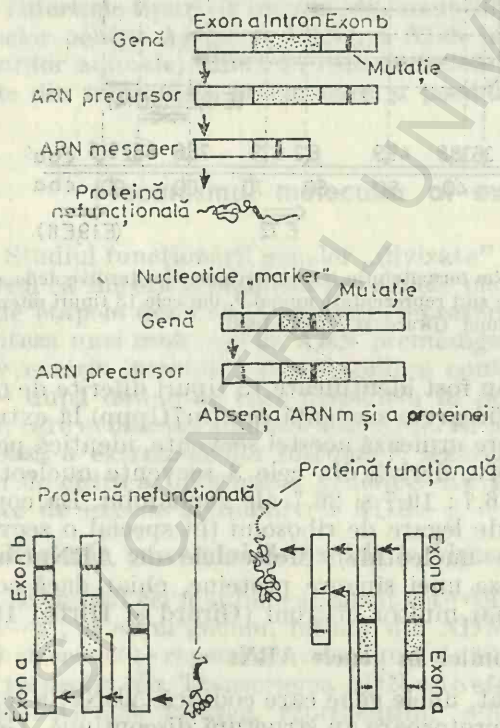


Fig. 273. — Demonstrarea participării unui intron în sinteza unei proteine funcționale, prin fuzionarea levurilor cu mutații la nivelul intronilor și exonilor genei *cob-box* mitocondriale (după Danchin și Slonimski, 1985).

suferă procese de excizie autonomă, fapt care demonstrează capacitățile sale autocatalitice. Capacitatea de autoexcizie a fost evidențiată și în cazul intronului 1 al genei *cob-box* din mitocondriile levurilor (fig. 273).

* Pentru detalii vezi capitolul „Descoperirea ARN cu activitate catalitică”, p. 495.

Mecanismul exciziei intronilor în mitocondrii

Rolul intronilor în sinteza enzimelor de excizie și înădărire (maturaze)

Datele cele mai semnificative asupra procesului de excizie a intronilor mitocondriali au fost obținute în laboratorul lui Slonimski, care a demonstrat natura „divizată” a genei *cob-box* de la levuri. Această genă are o structură și o funcție complexă reflectată și de denumirea sa: codifică citocromul *b*, controlează formarea citocromoxidazei și este formată din mai multe segmente („boxes”). Faptul că unele mutații la nivelul intronilor genei *cob-box* (ca și mutațiile în exoni) fac levurile incapabile să sintetizeze citocrom *b* activ a sugerat posibilitatea participării intronilor în codificarea și deci în sinteza acestuia la levuri. Această presupunere a fost confirmată de Slonimski, Kochko și Lamouroux (1978) utilizând testul de complementare, prin fuzionarea a două tipuri de celule de levură: *tipul A*, avînd o mutație într-un exon al genei *cob-box*, și *tipul B*, cu o mutație într-un intron al aceleiași gene (fig. 273).

În plus, un exon al genei *cob-box* conține o serie de nucleotide „marker” care, dacă sînt traduse, conferă proteinei respective o serie de proprietăți ușor de recunoscut.

Separat, cele două tipuri de celule *A* și *B* nu pot sintetiza citocrom *b* funcțional, spre deosebire de celula *C* rezultată din fuziunea lor. Datorită sistemului special de marcarea descris, s-a sugerat că în levurile de tip *C*, sinteza citocromului *b* s-a realizat prin traducerea exonului normal din celule de tip *B* (cu mutație în intron) și a intronului normal din celula de tip *A* (cu mutație în exon). Această ipoteză a fost confirmată de Slonimski, Jacq și Lazowska (1980), care, analizînd secvența bazelor în regiunea intronului 2 din gena *cob-box*, au arătat că din cele șase cadre de lectură teoretic posibile (cîte 3 pe fiecare catenă a ADN dublu helical), cinci nu pot fi folosite din cauza intervenției unui codon-stop care apare prematur. Un singur codon poate fi citit fără întrerupere pe o distanță mare și, în plus, „în fază” (în același cadru de citire) cu exonul precedent. Aceasta permite sinteza unei proteine codificate de exonii 1 și 2 ai genei *cob-box*, ca și de o secvență relativ lungă din intronul 2 (fig. 274)*.

Produsul acestei sinteze a fost identificat de Danchin și Slonimski (1985) ca o proteină enzimatică de excizie, denumită *ARNm-maturaza*. Ea are ca funcție principală excizia intronului 2 și conectarea exonilor 1—2 cu exonul 3. Prin acest mecanism este asigurată, pe de o parte, formarea ARNm matur, care codifică sinteza citocromului *b*, necesar în metabolismul respirator, și, pe de alta, distrugerea ARNm care codifică maturaza. Prin acest efect „matricid” (Danchin și Slonimski, 1985) este controlată sinteza maturazelor, care este menținută la o concentrație mică, asigurînd astfel o exprimare economică a funcționării genei.

Rolul maturazelor în reglare. Unele maturaze codificate de intronii mitocondriali au un rol adițional în coordonarea exprimării genelor mitocondriale și în reglarea sintezei proteinelor codificate de genele „divizate”. Astfel, maturaza codificată de intronul 4 excizează nu numai intronul

* După Slonimski (1985), intronul 1 ar fi autoexcizabil, ca și intronii genei ARNr, deoarece excizia lui nu este dependentă de sinteza proteinelor. *In vivo*, AMNm-maturaza ar putea accelera excizia lui autocatalitică.

respectiv, ci și un altul omolog, situat în gena mitocondrială *oxi 3*, care codifică o subunitate a enzimei complexe, citocromoxidaza. În acest fel, această maturază controlează simultan sinteza a două enzime, asigurând formarea lor în cantități corespunzătoare.

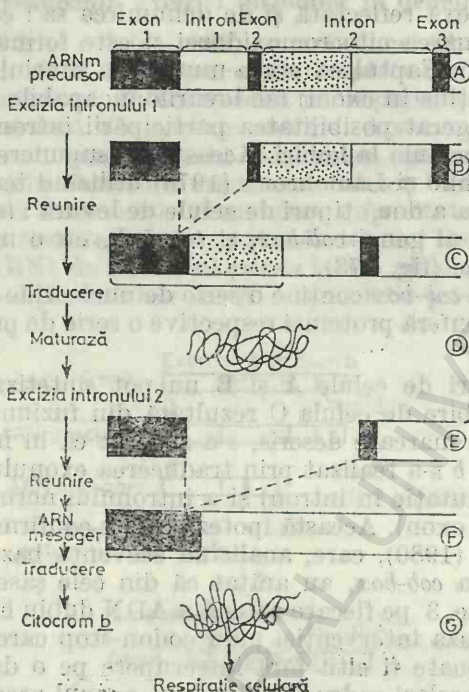


Fig. 274. — Rolul intronilor din genele mitocondriale ale levurilor în codificarea ARNm-maturatei (A—G) (după Danchin și Slonimski, 1985).

Mecanismul exciziei intronilor nucleari

Deși relativ mai mult studiat, mecanismul molecular al exciziei intronilor nucleari este foarte puțin cunoscut. Un progres deosebit a fost făcut după ce s-a demonstrat prezența unor secvențe nucleotidice specifice la granița dintre exoni și introni. Studiul secvenței nucleotidelor în aproximativ 90 de joncțiuni intron-exon a arătat că fiecare intron transcris începe cu nucleotidele GU (CT în ADN) și sfârșește cu AG (TC în ADN) (tabelul nr. 37).

Aceasta a sugerat posibilitatea existenței unor nucleotide cu rol de balize, care marchează limita dintre introni și exoni și care sînt reperate de sistemele enzimatice de excizie și legare (Chambon, 1981). După Danchin și Slonimski (1981, 1985), aceste secvențe nu sînt suficiente pentru a desemna fără ambiguitate locul exciziei, pentru îndepărtarea intronilor și legarea exonilor adiacenți, fără modificarea cadrului de citire a mesajului genetic, mai ales că secvențele GU și AG pot fi întâlnite relativ frecvent în moleculele de ARN pre-m, atît în structura intronilor, cit și în cea a exonilor. Ele ar servi în special pentru atragerea și reținerea complexului enzimatic de excizie-reunire, dar precizia și specificitatea acțiunii

Tabelul nr. 37

Secvența nucleotidelor la nivelul joncțiunilor dintre unii introni și exoni virali (după Lerner, Steitz și colab., 1980) *

Virusul	Situs donator	Intron	Situs acceptor	
SV40	ARNm tardiv	..CUG	GUAAGU.....UUUUUUUUCAG	G..
		..AAG	GUUCGU....UUUUUUUUUUCAG	G..
	..AAG	GUAAAU.....GUGUAUUUUUAG	A..	
	..GAG	GUAUGU.....GUGUAUUUUUAG	A..	
	Polioma	ARNm tardiv I	..CAA	GUAAGU.....UAUUUCCCUAG
ARNm tardiv II		..CAA	GUAAGU.....UUUAAUUCUAG	G..
		..CAA	GUAUUU.....UCUAUUUUUAG	A..
Secvența prototip	5'.ACAG	GUAAGU.....UYUYYYUXCAG	G...3'	

* Eliminarea intronilor are drept rezultat reunirea celor 3 nucleotide din stînga tabelului (exon 5') cu nucleotidul din extremitatea dreaptă (exon 3'). Tabelul arată identitatea secvențelor nucleotidice ale extremității 5' (situsul donator) și a celor din situsul acceptor 3' al intronilor. Stabilirea secvenței nucleotidelor înființate cel mai frecvent în ARN pre-m din celulele și virusurile animale permit definirea unei *secvențe prototip* (Breatnach și colab., 1978; Catterall și colab., 1978). Y = pirimidine.

lor ar implica participarea unor mecanisme adiționale. De la Salle, Jacq și Slonimski (1982) au sugerat că intronii s-ar replica în spațiu, luînd o formă complicată, dar bine definită structural, prin care extremitățile intronului s-ar apropia strîns una de alta. În felul acesta, secvențele care marchează „bornele” acestuia ar fi mai ușor de recunoscut și de deosebit de secvențele similare din structura ARN premesager, facilitînd excizia corectă. Lerner și colab. (1980), precum și Hernandez și Keller (1983) au sugerat posibilitatea participării unor molecule mici de *ARN adaptor*, cu secvențe nucleotidice complementare față de extremitățile intronilor. Ele ar putea acționa ca secvențe-ghid, favorizînd alinierea celor doi exoni adiacent, fără decalaj de fază. Această ipoteză este bazată pe un precedent demonstrat ca sigur: prezența unui component de tipul ARN, esențial pentru legarea specifică a ARNm, în structura ribonucleazei P (situs specifică) de la *E. coli*. Rolul unor molecule mici de ARN (ARN „splicer”) cu secvențe complementare față de extremitățile intronilor a fost studiat și de Padgett și colab. (1983), după care aceste molecule ar juca rolul de „gabarit” de asamblare, asigurînd apropierea celor doi exoni, fără modificarea cadrului de citire a mesajului genetic.

Rolul ARNsn

În ultimii ani, a fost evidențiată prezența în nucleu a unui număr important de molecule de ARN cu greutate moleculară mică (90–220 de nucleotide), denumite *ARN mic nuclear* (ARNsn—s = small; n = nuclear). Funcția lor este necunoscută, deși au fost descrise mai multe tipuri diferite, notate ARNsn U1, U2, U3, U4 etc. Determinarea secvenței baze-

lor a arătat că unele molecule de acest tip (spre exemplu, ARN_{sn}—U1 de la șoarece), au secvențe lungi, cu o mare complementaritate față de secvențele tip, caracteristice situsurilor de joncțiune dintre introni și exoni. Această particularitate permite supoziția că unele molecule de ARN_{sn} ar face parte din complexul enzimatic de excizie-sudare a ARN premesa-

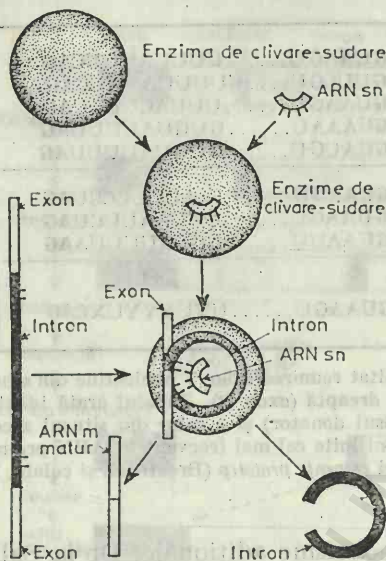


Fig. 275. — Modelul de maturare a ARN premesager cu ajutorul ARN nuclear mic (ARN_{sn}). Unele molecule de ARN_{sn} au secvențe omologe „secvențelor tip” prezente la extremitățile intronilor. Ele ar putea fi implicate în procesul de „înnădire” a ARN_m, probabil, prin menținerea în strinsă apropiere a extremităților intronilor pentru a putea fi clivate și reunite de enzimele corespunzătoare (după Watson și colab., 1983).

ger. Ele s-ar putea lega de extremitățile intronilor, aducând în contact situsurile donator și acceptor, la nivelul cărora se face joncțiunea a doi exoni adiacenți, menținându-le în contact strins, exact în fază, până când complexul enzimatic realizează clivarea ARN premesager și legarea exonilor (fig. 275).

În celulele animale infectate cu adenovirusuri, acest rol ar putea fi jucat de moleculele de ARN—VA (asociate virusului), codificate de genomul viral, care, de asemenea, poartă secvențe complementare față de secvențele de joncțiune ale intronilor și exonilor virali (fig. 276).

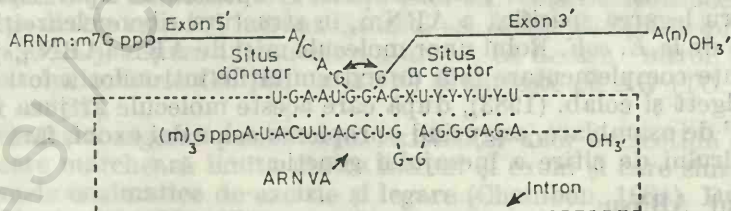


Fig. 276. — Mecanismul posibil al exciziei intronilor la virusurile animale. Moleculele mici de ARN VA (asociat virusului) pot aduce în contact strins situsurile donator și acceptor ale regiunii de joncțiune, formind o punte prin intermediul legăturilor de H (·) la extremitățile 5' și 3' ale intronului. După excizia intronului, cei doi exoni adiacenți sînt reușiți după cum indică săgeata dublă (↔). Secvența situsurilor donator și acceptor corespunde „secvenței tip” a situsurilor de joncțiune de la eucariote (după Girard și Hirth, 1980).

Maturarea ARN premesager la *Saccharomyces cerevisiae*

Brody și Abelson (1985), studiind maturarea *in vitro* a ARN premesager la *S. cerevisiae* au demonstrat că în fazele precoce ale procesului, acesta este întâlnit sub forma unui complex particulat, care sedimentează la 40 S. Acest complex, pentru care au propus denumirea de „spliceosome” (corpusecul de „înnădire” sau de maturare), ar fi format din ansamblul componentelor care participă în procesul de maturare a ARNm, prin excizia intronilor și reunirea exonilor. Funcția sa principală ar fi de a asigura plierea corectă a ARN premesager și de a menține producția acestei reacții inițiale într-o poziție fixă, necesară pentru ca reacțiile următoare să aibă loc rapid și exact. Existența acestui complex structural ar putea explica mecanismul prin care sînt puși în contact exonii, situați în localizări îndepărtate în molecula de ARN premesager.

Funcția intronilor nucleari. Inițial, intronii au fost considerați relictate evolutive lipsite de funcție sau „prețul” plătit de organismele eucariote pentru evoluție. Ulterior, Danchin și Slonimski (1980, 1985) au demonstrat că unii introni nucleari participă, alături de exoni, la formarea unor proteine speciale, *proteinele-mesager* (proteine-m = messenger), cu rol în formarea ARNm matur și în translocția lui prin membrana nucleară. Proteinele-mesager s-ar lega cu un capăt de membrana nucleară, iar cu celălalt, ar putea „recunoaște” moleculele de ARN pre-m pe cale de formare. Pe baza datelor experimentale au elaborat un model general de structură și funcție (fig. 277), corespunzând situației în care anumite gene ar codifica formarea proteinei-m — *maturaza* — prin informația cuprinsă într-unul din primii lor introni asociată cu aceea a exonilor care îi preced.

În consecință, maturaza ar avea o porțiune *introtip*, de natură hidrofobă, codificată de intron, localizată în membrana nucleară, și alta *exotip*, codificată de exoni, localizată în nucleu. Cînd ARN premesager care a produs deja maturaza este pe cale de a fi din nou tradus, are loc o atracție între exotipul maturazei și exotipul nou format. Datorită acestei atracții, complexul ARN premesager — ribosom — exotip este atras la nivelul porului nuclear, unde se găsește complexul enzimatic de clivare și legare — *splicaza* — care asigură excizia intronilor și reunirea exonilor. Se formează ARNm matur, care trece prin porul nuclear în citoplasmă (Danchin și Slonimski, 1985). În concluzie, funcția esențială a maturazei nucleare, codificată parțial de introni, este aceea de a pune moleculele de ARNm precursor într-o poziție corespunzătoare pentru ca excizia intronilor și legarea exonilor să aibă loc numai la un situs precis definit. Pe această cale, intronii genelor nucleare pot contribui la reglarea exprimării acestora. Acțiunea lor ar fi deosebit de eficientă, deoarece s-a demonstrat că o singură proteină-m poate acționa pe diferite molecule de ARN premesager controlînd în felul acesta simultan exprimarea mai multor gene.

Recent, Michel și Lang (1985) au identificat în structura intronilor mitocondriali de la *Neurospora crassa* patru secvențe capabile să codifice sinteza enzimei transcriptază inversă. Nu se știe dacă în mod normal această enzimă este efectiv sintetizată sub acțiunea lor. Unele date indirecte pledează pentru ideea că acești introni ar fi funcționali și că enzima produsă ar fi implicată în transpoziția lor.

Semnificația biologică a acestei descoperiri este interpretată diferit, unele argumente pledînd pentru o relație mai mult sau mai puțin directă cu retrovirusurile :

1) este posibil că sinteza transcriptazei inverse codificată de introni a furnizat o enzimă necesară pentru originea retrovirusurilor, care ar fi putut lua naștere prin desprinderea acestei gene esențiale din genomul celular, de către elementele genetice transpozabile ale ADN;

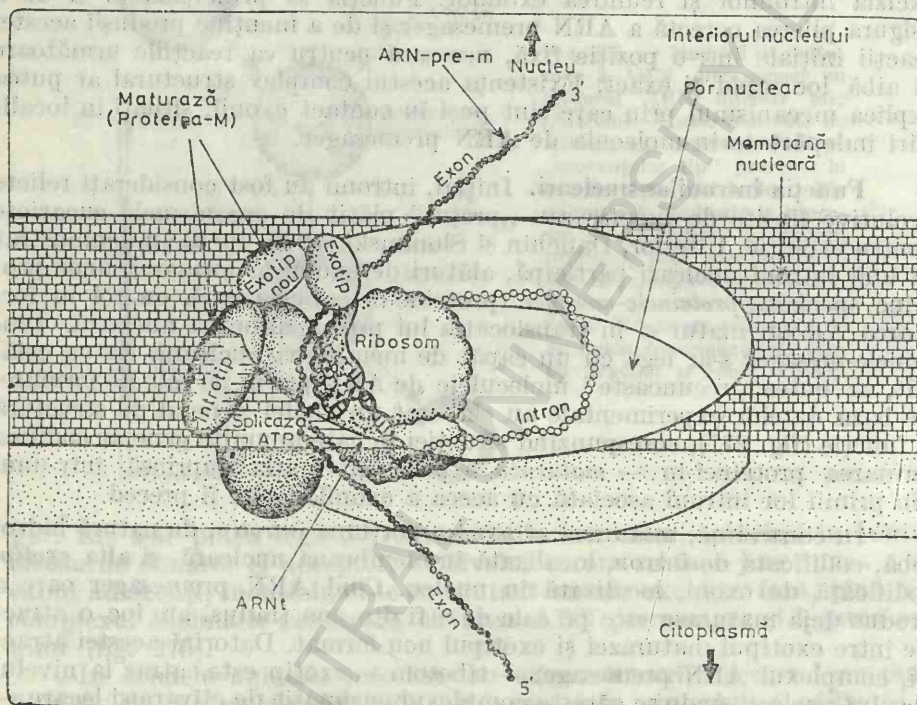


Fig. 277. — Modelul general de structură și funcție privind mecanismul de excizie a intronilor și de reînțire a exonilor sub acțiunea complexului enzimatic de clivare și legare — splicaza (după Slonimski și Danchin, 1985).

2) este, de asemenea, posibil că aceste secvențe ar reprezenta mai degrabă rămășițe ascunse decât o sursă de informație genetică abandonată de retrovirusuri pentru sinteza enzimei;

3) după o altă ipoteză însă, capacitatea intronilor de a codifica o enzimă implicată în propria lor excizie sugerează o existență semiautonomă a lor în mitocondrii și posibilitatea deplasării ocazionale în genomul celular (Lewis, 1985).

Date recente permit supoziția existenței unei activități endonucleazice codificate de introni. Or, după cum se știe, acest tip de enzime sînt, de asemenea, prezente la retrovirusuri, la care au o importanță crucială în inserția lor în ADN „țintă”.

În cazul proteinelor care au o structură alcătuită din domenii repetate, repetarea este oglindită în distribuția intronilor. Situația este simi-

lară pentru acest tip de proteine în general. Beta-2-microglobulinele, imunoglobulinele, antigenele de histocompatibilitate, receptorii limfocitelor T etc., conțin în funcție de natura lor 1–5 exoni (Gilbert, 1985). Tripla repetiție caracteristică pentru α -fetoproteină, albumină sau ovomucoid este rezultatul triplării structurii de bază exon–intron.

Helixul de collagen este construit pe baza repetării de 40 de ori a unui exon care formează o jumătate de tură (Boedtker și Aho, 1984). De aici s-a născut ideea că intronii servesc pentru asamblarea genelor care codifică proteinele cu structuri repetate.

Originea și semnificația evolutivă a intronilor

Controversele privind modul de apariție a intronilor sînt intim corelate cu cele privind natura informației genetice primordiale și a primului organism ancestral apărut pe pămînt. Ele au dus la formularea a două categorii de ipoteze care, în variantele lor extreme, admit că: 1) intronii au apărut prin inserția unor secvențe de ADN necodificatoare în gene care au avut la origine o structură continuă; 2) intronii ar fi linkeri vestigiali (relicte), sub forma unor lungi secvențe de ADN, situate între secvențe codificatoare utile. Ei au avut la începutul evoluției funcția de a le lega și de a le menține într-un anumit cadru de citire, acționînd astfel pentru asamblarea unei gene și au dispărut ulterior din structura celulelor procariote (Gilbert, 1985).

Dulbecco (1979) propune un scenariu pentru evoluția celor două tipuri de gene (cu structură continuă și discontinuă), care explică, în parte, unele diferențe fundamentale, în primul rînd, în strategiile de supraviețuire adoptate de procariote și eucariote. Procariotele intră în competiție cu restul lumii vii, avînd metabolismul extrem de activ din care decurge marea lor viteză de creștere și multiplicare. Aceasta a condiționat organizarea informației genetice sub forma unui ansamblu compact de gene, sărace în ADN necodificator și în secvențe repetitive, nefragmentate și cu un spațiu minim între ele, totul acoperit de un perete celular rigid care reprezintă o structură importantă de apărare. Multiplicarea rapidă a necesitat cuplarea transcrierii cu traducerea și a făcut inutilă atît existența membranei nucleare, cit și a oricărei forme de prelucrare și de maturare a ARNm.

În cursul evoluției, cînd a fost nevoie de formarea unei gene noi, procariotele au recurs, probabil, la recombinarea genetică, prin fuzionarea altor două gene existente. Deoarece acest proces decurge lent (pentru a asigura fidelitatea necesară) procariotele „au descoperit” o modalitate de a grăbi evoluția prin apariția elementelor genetice transpozabile (Bukhari și colab., 1977).

Prin contrast cu procariotele, celulele eucariote au ales o strategie diferită pentru supraviețuire. „Învățînd” să se hrănească cu bacterii, celulele animale le-au lăsat acestora capacitatea de a face cele mai complexe și neașteptate sinteze, dobîndind în felul acesta răgazul pentru a-și mări considerabil genomul prin duplicări genice repetate (Dulbecco, 1979). Genomul mărit, deși în mare parte neutilizat, nu a reprezentat o sarcină

prea grea pentru celule, ci din contra a permis o evoluție complexă. Aceasta a implicat separarea genomului în celulă, pentru a-l proteja de enzimele necesare pentru digerarea bacteriilor înglobate. Membrana nucleară a permis acumularea produșilor (ARN premesager) rezultați din transcrierea genelor în nucleu și prelucrarea (maturarea) lor, fără grabă, pentru a-i utiliza cât mai eficient. Probabil că enzimele de clivare și excizie au fost ancestrale, iar apariția celor de legare a „fragmentelor” de gene nu a ridicat probleme speciale. Exprimarea genelor „fragmentate” este mult mai lentă, dar pentru multe funcții celulele organismelor complexe „nu se grăbesc” (Dulbecco, 1979). Marea frecvență a genelor divizate în celulele diferențiate terminale s-ar explica și prin faptul că aceste gene nu se exprimă rapid. Esențial pentru celulele respective este să producă mult și corect, dar nu obligatoriu și rapid. În favoarea acestui punct de vedere a fost adus ca argument și faptul că genele pentru histone, care trebuie exprimate rapid pentru a răspunde cantitativ nevoilor determinate de replicarea ADN, sînt nesegmentate.

Un punct de vedere diferit este exprimat de cercetătorii care consideră că intronii ar reprezenta particularități vechi ale genelor, care, în unele cazuri, ar fi fost pierdute complet în timp (ca la procariote) sau selectiv (Lewin, 1982). După Chambon (1981), absența lor la procariotele actuale s-ar explica fie ca rezultat al dispariției prin deleție, fie prin faptul că procariotele actuale nu ar fi reprezentative pentru cele ancestrale. Reaney (1979), care pledează pentru caracterul primordial al ARN ca material genetic în cursul evoluției sistemelor replicative ancestrale, susține că existența unui mecanism imprecis de clivare și reunire („splicing”) ar fi fost deosebit de avantajos în evoluția sistemelor precelulare. El ar fi permis producerea unui număr mare de molecule diferite, prin reasortarea unor fragmente, care puneau în continuitate informația utilă, inițial dispersată de-a lungul genomului.

Gilbert (1985) consideră că problema originii intronilor poate fi abordată experimental, studiind genele „vechi”, adică cele ai căror produși au existat înainte de separarea dintre procariote și eucariote în cursul evoluției. Acest studiu ar putea permite deosebirea intronilor vechi, preexistenți, care au fost pierduți de procariote și de eucariotele inferioare de cei care au fost creați în cursul evoluției pînă la vertebrate, fie prin inserție într-o genă continuă, fie prin reunirea unor elemente genetice mai simple. În această categorie intră genele care codifică sinteza enzimelor ce participă în procesele biochimice fundamentale, cum sînt cele ale căii glicolitice. Ele au o structură tridimensională în toate celulele. În prezent, sînt riguros caracterizate trei gene „vechi”, care codifică gliceraldehidfosfat-dehidrogenaza (GADPH, cu 11 introni), piruvat kinaza (PK, cu 9) și triozofosfat izomeraza (TIM, cu 6 introni). Exonii au măriri foarte regulate corespunzînd la ~ 30–40 de aminoacizi, în așa fel încît numărul intronilor reflectă indirect mărimea globală a proteinelor. Aceste gene vechi au o structură continuă atât la procariote, cît și la eucariotele inferioare (levuri).

S-a demonstrat că la eucariote poziția intronilor nu este întâmplătoare. Aceasta sugerează că ei marchează schimbări de direcție în structura secundară a proteinelor respective, care par să fie asamblate din peptide exonice. Dacă asamblarea acestor proteine este dependentă de poziția

intronilor, în genele respective, absența lor la procariote și la levuri poate fi explicată ca rezultat al pierderii lor din structura determinantilor genetici pe care îi divizau. Studiile comparate asupra genei *TIM* de la porumb și găină au demonstrat prezența în cele secvențializate a cinci introni la porumb. Trei introni au poziții identice la porumb și la găină, unul este deplasat cu trei nucleotide, iar al cincilea a fost, probabil, pierdut la găină în cursul evoluției. Aceste date demonstrează, după Gilbert (1985), că gena ancestrală din celula progenitoare a eucariotelor avea o structură discontinuă, înaintea momentului de separare a primelor alge și celule animale (acum peste un miliard de ani). Ele presupun, totodată, că organismele procariote, ca și eucariotele „inferioare” au pierdut intronii în cursul evoluției. Pe plan mai general, aceste date demonstrează că proteinele nu sînt simple mozaicuri de structuri simple sau asamblări combinatoriale ale produsilor mai multor minigene. Cunoașterea amplasării intronilor și a structurii exonilor poate lămuri structura produsilor lor, normele care dirijează „potrivirea” lor perfectă și decurgînd din aceasta „regulile de creare a proteinelor”, principiile care stau la baza plierii lor și a formării structurii spațiale caracteristice, care le condiționează activitatea.

Semnificația evolutivă a prezenței genelor divizate la bacterii

Woese (1983) a arătat prezența genelor divizate la *Archaeobacteria*, grup de microorganisme care include bacteriile metanogene, unele halofile și termofile extreme, caracterizate printr-o serie de particularități deosebite de cele ale eubacteriilor*. Această descoperire a fost cu totul neașteptată, deoarece prezența intronilor în celulele eucariote a fost considerată ca rezultatul unei apariții tardive în cursul evoluției speciilor. Acest punct de vedere era în acord cu ideea aproape unanim acceptată, după care procariotele care au gene cu o structură continuă ar fi apărut pe Pămînt cu mult înainte de apariția eucariotelor. Ideea unei origini primordiale a celulelor eucariote a fost emisă de Doolittle (1978) într-o ipoteză care preconizează o istorie evolutivă inversă, după care genele „divizate” ar fi apărut primele, ca o necesitate impusă de faptul că procesele de replicare, transcriere și traducere a ADN se făceau cu un grad mare de infidelitate. În aceste condiții, primele organisme monocelulare au avut nevoie de mai multe copii ale aceluiași exon, pentru ca măcar una dintre ele să asigure sinteza unei proteine corecte. Aceasta a făcut ca genele organismelor primitive să fie clivate în mai multe unități sau exoni, separate de secvențe necodificatoare. Rolul acestora ar fi fost de a permite recombinația exonilor. Prin excizia intronilor dintr-un cromosom primitiv a devenit posibilă apropierea a doi exoni, care codificau, fiecare, o mică proteină. Cînd în cursul evoluției a devenit posibilă exprimarea simultană a unor grupuri de exoni, s-au putut forma primele proteine mari, prin combinarea activității proteinelor mici. În felul acesta, a fost mult accelerat procesul de dobîndire de funcții biologice noi de către organismele primi-

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, p. 467.

tive. Teoretic, este mult mai simplu de obținut o genă mai mare, și deci o proteină mai mare, prin combinarea unor secvențe nucleotidice (exoni) și a unor proteine mici preexistente, decât printr-un proces de evoluție treptată. Aceste argumente pledează, după Doolittle (1978), împotriva caracterului primordial al genelor cu structură continuă, caracteristice eubacteriilor și vin în sprijinul concepțiilor lui Woese (1983). După acesta, primele organisme care au apărut pe Pământ au fost arhebacteriile, de la care au evoluat eucariotele. Un punct de vedere similar este susținut și de Chambon (1982), pentru care procariotele actuale nu sînt strămoșii eucariotelor, ci descendenții unor celule care posedau introni și care în cursul evoluției au eliminat treptat informația necodificatoare, mărindu-și viteza de creștere prin scăderea cantității de ADN, ce trebuie replicat la fiecare generație. Cînd toți intronii au fost eliminați, sistemul de prelucrare a ARN pre-m a devenit inutil, ca în cazul procariotelor.

În schimb, la eucariote pe măsură ce organismele respective au evoluat, deoarece excedentul de ADN necodificator nu a impus o sarcină energetică semnificativă, acest sistem s-a rafinat, devenind un instrument excelent pentru a produce unele gene și funcții noi, din altele vechi pe mai multe căi:

1) Îndepărtarea intronilor poate acționa ca un mecanism evolutiv puternic, pentru că permite asamblarea pe module, în proteine, a unor blocuri de informație genetică ce au evoluat independent. Cînd exonii deveniți apropiați se puteau exprima simultan, ei au fost folosiți de celule pentru a forma proteine mari sau complexe, mai ușor decât printr-un proces secvențial de mutații.

2) Evenimentele care apar la granițele regiunilor ce trebuie reunite pot modifica ordinea legăturilor lor prin aditia sau deleția unor întregi secvențe de baze și, în consecință, a unor aminoacizi în structura proteinelor.

3) Prezența exonilor separați mărește frecvența cu care mutațiile avantajoase în exoni diferiți (pe două alele) pot fi aduse împreună cu dublu avantaj într-o singură genă (fig. 278).

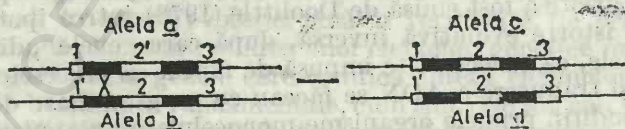


Fig. 278. — Prezența intronilor poate fi benefică pentru evoluție prin reducerea timpului în care mutațiile avantajoase, situate în exoni diferiți pe două alele, pot fi grupate în aceeași genă dublu avantajoasă. *Stg.* — schema prezintă două alele (*a* și *b*) ale unei gene în care exonii 1' și 2' cu mutații codifică un produs proteic îmbunătățit *dr.* — recombinația dintre secvențele omologe într-un intron produce o alelă nouă *d*, în care cei doi exoni avantajoși sînt asociați în aceeași genă (după Chambon, 1984).

4) Apariția unor proteine noi în cursul evoluției s-ar face mai rapid cînd informația genetică (exonii) este răspîndită pe o regiune mai mare în structura ADN, deoarece ar favoriza mărirea frecvenței recombinărilor genetice.

5) Prelucrarea ARN pre-m poate fi corelată cu o evoluție la nivel molecular ilustrată de structura moleculelor de imunoglobuline—anticorp.

Ig sînt constituite din domenii rigide, separate prin puncte flexibile („balama”). Diferitele domenii ale Ig corespund unor secvențe codificatoare diferite în ADN, separate de altele intronice. „Înnădirea” adună diferitele segmente într-o proteină unică. De aceea, Gilbert (1980) consideră că Ig reprezintă cel mai evident exemplu de „rearsortare” („shuffling”) a exonilor, atît în termeni structurali, cît și funcționali. Pe lîngă faptul că exonii diferiți codifică anumite domenii ale întregii molecule, producerea diversității anticorpilor implică „rearsortarea” exonilor, care codifică regiunile de legare a antigenelor.

Intronii ca elemente genetice transpozabile

Woo și Leicht (1982) au emis ipoteza că unii introni ar fi vestigii ale unor elemente genetice transpozabile care au fost intercalate între „exonii” preexistenți, respectiv între două „gene”, după divergența lor de la o genă ancestrală. Unele fapte de observație confirmă această ipoteză, atribuind chiar intronilor actuali capacitatea de a-și schimba poziția de la o localizare la alta în structura moleculei de ADN. Astfel, studiul poziției genelor care codifică citocromul *b* la diferite tulpini de levuri, funghi filamentoși, ca și la unele plante a arătat că intronii genei respective nu sînt localizați în același loc în cadrul genei. Aceasta sugerează, după Woo și Leicht, că intronii pot fi excizați ca și elementele genetice transpozabile și că, asemeni transpozonilor, s-ar putea deplasa în structura ADN, părăsind o genă sau „invadînd” alta, fiind prezenți la unele organisme și absenți la altele. Mobilitatea lor ar fi asigurată de enzime speciale, de tipul maturazelor sau de altă natură, codificate de ei înșiși. Ori de cîte ori se întîmplă ca intronii „să cadă” între două regiuni codificatoare, sînt păstrați datorită avantajelor care decurg din posibilitatea regrupării exonilor. În felul acesta, rearsortarea exonilor ar fi un fenomen secundar, care urmează unei inserții avantajoase a intronilor (Lewin, 1982). Acest mecanism ar explica diferențele de număr și de poziție ale intronilor, precum și faptul că introni asemănători ca structură internă pot fi găsiți în gene diferite și chiar la organisme diferite.

Există însă și o serie de argumente împotriva acestui punct de vedere. Unul dintre cele mai semnificative este cel furnizat de genele pentru imunoglobuline (Ig), în care intronii ocupă poziții „fixe”, în așa fel încît exonii pe care îi separă codifică un anumit „domeniu” al moleculei de Ig, adică un anumit subansamblu al arhitecturii moleculare a acesteia.

Rearsortarea exonilor („Exon shuffling”)

Fenomenul a fost descris de Südhof și colab. (1985), analizînd structura intron—exon a genei care codifică sinteza receptorului LDL („lipoprotein low-density”). Acest receptor membranar leagă particulele de lipoproteine cu densitate mică și permite internalizarea lor în celulă. Subdiviziunile funcționale ale acestei proteine-receptor sînt reflectate în struc-

tura genei care o codifică, alcătuită din 18 exoni. În mod neașteptat, Südhof și colab. (1985) au demonstrat că o mare parte din gena pentru receptorul LDL este formată din exoni proveniți din alte gene. Astfel, un segment care corespunde la 400 de aminoacizi are un grad important de omologie cu precursorul factorului de creștere epidermic (FCE). Un alt segment de 40 de aminoacizi, bogat în cisteină, codificat de un singur exon, este repetat de trei ori în genele receptorului LDL și FCE și o singură dată, ca un exon separat în factorul proteic IX pentru coagularea singelui (Anson și colab., 1984) și în alte două proteine implicate în coagularea singelui, factorii X și proteina C (Doolittle și colab., 1984). În sfârșit, domeniul de legare al LDL din structura receptorului respectiv conține o secvență de 40 de aminoacizi repetată de șapte ori, prezentă odată și în structura factorului C9 al sistemului complement. Aceste date demonstrează că gena pentru receptorul LDL este un adevărat mozaic de exoni, derivați din alte surse diferite și că una din funcțiile intronilor este aceea de asamblare a genelor care au fost produse tardiv în cursul evoluției (Gilbert, 1985).

Exonii pot fi frecvent corelați cu anumite elemente funcționale ale proteinelor codificate. Astfel, secvențele-semnal hidrofobe, care sînt legate de moleculele destinate exportului din celulă, sînt adesea purtate de exoni separați. În mod similar, porțiunile transmembranare, citoplasmice și „balama” ale imunoglobulinelor sînt codificate de exoni separați (Gilbert, 1985).

Semnificația biologică a genelor cu structură discontinuă la virusuri. Prezența genelor „divizate” în genomul viral și a proceselor de maturare a ARNm reprezintă, în primul rînd, o modalitate de a face, pe mai multe căi, economie de material genetic :

1) Gruparea mai multor gene sub controlul unui singur promotor și „fragmentarea” ARN pre-mesager în mai multe molecule de ARNm avînd una și aceeași secvență „leader” reprezintă, pe lîngă economia de material genetic, și posibilitatea de reglare coordonată a exprimării genelor respective la nivelul transcrierii. Dacă fiecare genă virală ar fi transcrisă independent, fiecare ar trebui să aibă propria sa secvență „leader” independentă. Or, la virusuri aceste secvențe sînt lungi și adesea multiple, pentru a favoriza traducerea prioritară a ARNm viral față de cel celular.

2) În cele mai multe cazuri, clivarea ARN pre-m este utilizată ca un dispozitiv pentru obținerea a mai multe molecule diferite de ARNm, de la același segment de ADN : 2 sau 3 la retrovirus, cîte 3 timpurii și 3 tardive la polioma și 13 mesageri diferiți pentru informația tardivă la adenovirus. Datorită acestui mecanism, întreaga informație genetică este utilizată pentru codificare într-un ARNm sau în altul, în funcție de modul în care sînt redefinite joncțiunile dintre introni și exoni. De aceea, uneori este imposibil de deosebit informația cu rol de codificare de cea fără sens : o secvență cu rol de exon într-un ARNm poate funcționa ca intron în altul. Întregul mecanism ar putea avea ca funcție principală exprimarea separată a diferitelor secțiuni ale genomului. El ar putea coordona, în plus, frecvența relativă a diferitelor tipuri de ARNm rezultate și deci intensitatea relativă a exprimării diferitelor funcții genetice.

3) Genele „discontinue” și prelucrarea ARN pre-m furnizează o posibilitate suplimentară de utilizare economică a informației, prin crea-

rea unor cadre de citire diferite ale mesajului genetic. Astfel, la virusul Polioma, atât informația „timpurie”, cât și cea tardivă furnizează câte 3 tipuri de ARNm, care rezultă din diferite clivări și „înnădiri” ale aceluiași ARN pre-m. Doi dintre ei sînt „cititi” în fază normală, dar după lungimi diferite, în timp ce al treilea este „citit” defazat (Dulbecco, 1979). În cazul virusurilor cu genom ADN există probe evidente că mai multe proteine diferite sînt codificate de o regiune dată a genomului, în funcție de modul în care este clivat și resodat ARNm precursor. Prin utilizarea complexă a acestor mecanisme moleculare, unele virusuri „reuşesc” să-și asigure o replicare rapidă, deși au un genom foarte mic.

Semnificația biologică a intronilor. Prezența atât de răspîdită a intronilor pledează în favoarea unui anumit rol și a unor funcții importante pentru celulele eucariote, de care procariotele nu au nevoie. Obținerea de gene lipsite de introni, prin tehnici de inginerie a genelor, a demonstrat că numai unele funcționează normal, producînd ARNm funcțional activ. În multe cazuri, apar perturbări, deoarece absența intronilor naturali blochează ieșirea ARNm din nucleu în citoplasmă, probabil datorită unei configurații neobișnuite a sa, incompatibilă cu translocția prin membrana nucleară. În afară de rolul jucat — alături de exoni — în codificarea proteinelor-mesager (maturaze), după Danchin și Slonimski (1985), prezența intronilor reflectă o anumită necesitate care ține de una din diferențele esențiale dintre eucariote și procariote și anume, de existența diferențierii celulare în cazul celor dintîi. Ei ar îndeplini o funcție de reglare a exprimării genelor cromosomale în nucleu, încă din timpul dezvoltării embrionare. În mod direct sau prin intermediul produselor lor, intronii ar coordona diferențierea celulară, formarea diferitelor țesuturi embrionare și ar controla — printr-un mecanism încă necunoscut — modul în care diferite gene sau grupuri de gene inițiază în momente precise și în cantități adecvate sinteza anumitor proteine.

În sprijinul acestei concepții, Danchin și Slonimski (1985) aduc următoarele argumente: 1) anumite secvențe intronice au variat mult mai puțin în cursul evoluției, comparativ cu exonii adiacenți; 2) în unele cazuri, secvența nucleotidică a intronilor poate fi citită sub forma unor triplete-sens pe lungimi mari și în același cadru de citire cu exonul precedent; 3) în multe cazuri, informația din introni codifică aminoacizi hidrofobi, ceea ce ar permite produsului proteic respectiv să se lege de membrana nucleară bogată în lipide; 4) prezența în nucleu a tuturor constituenților necesari pentru traducerea ARNm la proteine.

O genă mai multe proteine. Și alte fapte de observație neobișnuite, pledează pentru atribuirea unui rol important al intronilor în biologia celulei eucariote. Astfel, s-a demonstrat că procesul de excizie și „înnădire” poate varia în funcție de stadiul diferențierii celulare. Ca urmare, o secvență care într-un stadiu poate funcționa ca intron, în altul se comportă ca exon. S-a demonstrat că intronul 2 din gena citocromului b, spre exemplu, activează ca exon pentru a codifica proteina-m sau maturaza. În plus, faptul că procesul de excizie poate să producă diferite molecule de ARN, de la același ARN pre-m, respectiv de la aceeași genă, permite producerea unor proteine diferite de la aceeași secvență nucleotidică. Fenomenul a

fost descris la adenovirusuri, la virusurile polioma și SV40, ea și pentru ARNm care poartă mesajul pentru Ig.

Un caz particular, deosebit de interesant, a fost evidențiat de Evans și Rosenfeld (1982), la șobolan, la care de la aceeași genă, respectiv de la același ARN pre-matur, utilizând căi diferite prin clivarea genei „calcitonină” * în situsuri diferite, se produce două tipuri de ARNm matur, care au extremitățile 5' comune și cele 3' diferite (fig. 279). Călea paratiroidiană produce

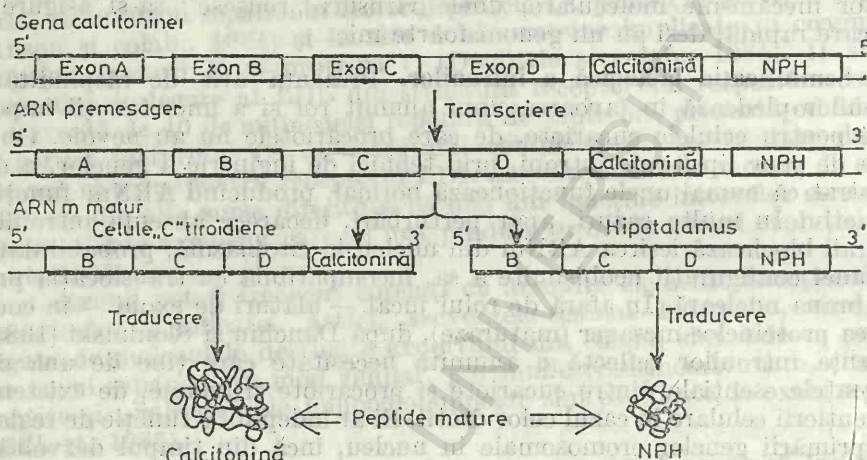


Fig. 279. — Gena calcitoninei este transcrisă la o moleculă de ARNm precursor, care poate fi clivată pentru a produce două forme de ARNm matur: unul care codifică sinteza calcitoninei, în special în glanda tiroidă, iar celălalt, sinteza unui neuropeptid în hipotalamus (după Watson și colab., 1983).

un ARNm cu secvența calcitonină la extremitatea 3', care codifică hormonul calcitonina, iar calea hipotalamică, un neuropeptid, prezent în hipotalamus și hipofiză, numit inițial produsul înrudit al genei calcitoninei. Acest fenomen neobișnuit relevă, după Danchin și Slonimski (1985), o cale de inovație genetică, prin faptul că adaugă conceptului de mobilitate genetică datorat elementelor genetice transpozabile, ilustrat în special la procariote, unul nou, de flexibilitate în exprimarea genetică, datorat exciziei intronilor și sudării exonilor adiacenți, în celulele eucariote.

Descoperirea genelor cu structură discontinuă impune înlocuirea noțiunii de *cistron*, ca unitatea genetică de funcție care codifică un lanț polipeptidic, cu aceea de *unitate de transcriere*, care conține, pe lângă secvențele cu rol de codificare și regiuni ce vor fi „pierdute” când se formează ARNm matur. O altă consecință teoretică a modelului de organizare exonică—intronic a genelor este aceea de infirmare a dogmei „o genă — un polipeptid”. Gena, secvență de nucleotide contigue în molecula de ADN, corespunzătoare unei unități de transcriere, poate codifica mai multe lanțuri polipeptidice, cu funcții înrudite sau diferite (Weeger, 1980).

* Calcitonina este un hormon polipeptidic secretat de celulele C ale glandei tiroide și uneori de timus și paratiroide. Ea diminuează concentrația calciului și fosforului în plasmă și inhibă rezorbtia țesutului osos.

Descoperirea ARN cu activitate catalitică

„...Și astfel, una din marile supoziții ale biologiei, aceea că numai proteinele pot avea activitate de catalizatori biologici s-a năruit în fața unor probe de necontestat”...

R. LEWIN

În anul 1982, Cech și colab., au arătat că molecula precursor a ARN de la protozoarul ciliat *Tetrahymena thermophila*, acționind asemănător unui catalizator, poate efectua, singură, fără intervenția unei proteine enzimatice, o reacție biochimică. Ea conține un intron de 413 nucleotide, care poate fi excizat, fără enzime și fără consum de energie, după care cele două fragmente rezultate sînt reunite pentru a forma o moleculă de ARN matur (fig. 280).

In vivo, acest proces are loc mai rapid decît *in vitro*, probabil datorită intervenției unor proteine care îl accelerează. Reacția descrisă este evasi-catalitică, deoarece ARNr, descris sub denumirea de *ribozim* (Cech, 1982), nu îndeplinește un criteriu esențial al catalizatorilor adevărați, anume acela de a rămîne neschimbat la sfîrșitul reacției. El este modificat la sfîrșitul acesteia și nu mai poate cataliza altă reacție similară.

Adevăratul tip de ARN catalizator a fost descoperit încă de Guerrier-Takada, Gardiner, March, Pace și Altman (1983), cu o ocazia studiului

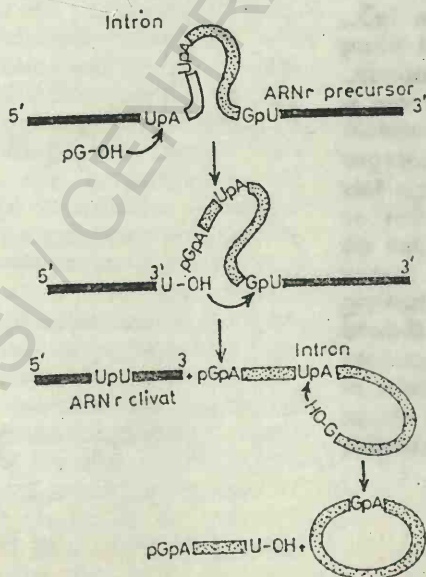


Fig. 280. — Autoexcizia unui intron de 413 baze din molecula de ARNr precursor de la *Tetrahymena*. Clivarea inițială este catalizată de o moleculă de GMP care atacă legătura fosfodiester dintre două baze specifice (UpA) la extremitatea 5' a intronului. GMP este adăugat la extremitatea 5' a ADN clivat. Se formează un hidroxil-3', la limita 3' a exonului, care atacă legătura fosfodiester dintre alte două baze (GpU), la extremitatea 3' a intronului, formînd o moleculă de ARNr „înnădită” corect. Intronul excizat — suferă apoi o nouă reacție de excizie și reunire, care produce o moleculă circulară de ARN și un scurt fragment linear (după Watson și colab., 1983).

ribonucleazei P de la *E. coli*. Ribonucleaza P prezintă la numeroase categorii de organisme inferioare și superioare este o ribonucleoproteină care clivează precursorii moleculelor de ARNt, pentru a produce secvențele terminale corecte ale ARNt matur. Ea conține ponderal de 5 ori mai mult ARN (ARN M1) decât proteină (fracțiunea proteină C5). Componenta ARN liberă clivează precursorii ARNt, la situsul corect de specificitate, în timp ce proteina liberă este inactivă. Activitatea catalitică a ARN nu este rezultatul contaminării cu proteine enzimatică, deoarece poate fi reprodusă cu produsul obținut prin transcrierea genei respective *in vitro*, în condiții care exclud posibilitatea intervenției unei proteine asociate.

Considerată drept una din cele mai fascinante descoperiri ale biologiei moleculare, existența ARN cu rol de catalizator permite presupunerea că acesta ar putea îndeplini o serie de funcții catalitice importante. Datorită flexibilității lor mai mari în raport cu moleculele de ADN și capacității de a acționa cu mai mare ușurință la distanțe mai mari decât proteinele, moleculele de ARN ar putea avea un mare potențial funcțional (Lewin, 1984). Această descoperire sugerează, de asemenea, că numeroase molecule mici de ARN, prezente în toate celulele și a căror funcție este în prezent necunoscută, ar putea avea un rol foarte important și că în numeroasele asocieri ARN-proteine, ARN ar avea un rol mult mai semnificativ decât cel pasiv structural. În sfârșit, în ansamblul ipotezelor privitoare la originea vieții, existența ARN catalizator permite supoziția existenței unei perioade inițiale, mai primitivă, în raport cu aceea în care au început să evolueze constituenții „mașinării” genetice și metabolice acceptați de multe din ipotezele actuale.

REGLAREA GENETICĂ A ACTIVITĂȚILOR CELULARE

„Armonia genelor are ceva de aceeași grandoare ca și armonia sferelor celeste, dar cu diferența că armonia genelor nu este imuabilă. Ea este mai degrabă un coral lin, superb adaptat prezentului, tinzind însă să rămână în armonie cu un viitor nesigur”.

SALVADOR LURIA

„Cel mai simplu organism, cea mai puțin importantă bacterie trebuie să „cunoască” tipul de hrană pe care o are la dispoziție și să-și adapteze metabolismul în consecință. La micro-organisme, perceperea și reacția sînt riguros determinate de gene. Ele se reduc, fiecare, la o alternativă : da sau nu. O bacterie poate să perceapă numai ceea ce îi permite programul său genetic : să deceleze un anumit compus, cu ajutorul cîtorva proteine, care îl „recunosc”, fiecare în mod specific. Pentru o bacterie, lumea exterioară se reduce la cîteva substanțe dizolvate”...

F. JACOB

Organizarea activităților celei bacteriene

Controlul și integrarea funcțiilor celulare

„Logica sistemelor de reglare se bazează pe ambiția fiecărei bacterii de a produce două bacterii cu o cheltuială minimă”.

F. JACOB

Viața celulelor bacteriene, ca și a altor organisme este subordonată funcționării coordonate a unui mare număr de sisteme enzimatică care catalizează diferite reacții biochimice implicate în metabolismul celular. Natura, cantitatea și activitatea acestor enzime sînt reglate în așa fel încît să se asigure celulelor un echilibru stabil sub raportul conservării caracterelor lor specifice, dar, în același timp, suficient de suplu și de dinamic pentru a le permite o adaptare continuă la condițiile schimbătoare ale mediului. La nivel molecular deci, adaptabilitatea (capacitatea de a răspunde la modificările permanente interne și externe), una dintre proprietățile fundamentale ale sistemelor biologice, se reflectă prin existența unei serii de mecanisme care permit celei să-și regleze continuu marea gamă de funcții coordonate de căile metabolice, în acord cu exigențele mediului.

Aceste mecanisme au fost studiate cel mai amănunțit la bacterii, care reprezintă un model experimental, deosebit de adecvat pentru studiul mecanismelor de autoreglare datorită, pe de o parte, marelui volum de cunoștințe existente cu privire la structura, compoziția chimică, metabolismul și genetica lor, iar, pe de altă parte, simplității de organizare și marii lor plasticități funcționale. Simplitatea organizării interne și deosebita plasticitate fiziologică a acestor organisme unicelulare le asigură supraviețuirea și adaptarea chiar în cazul unor variații ale factorilor de mediu reprezentînd abateri relativ largi de la ceea ce reprezintă condițiile optime ale activității metabolice caracteristice speciei. Dimpotrivă, activitatea celulelor cu un grad superior de diferențiere este condiționată de existența unui mediu aproximativ constant, iar reglarea ei se realizează prin intrarea în joc a unor mecanisme mult mai complexe. Mai mult decît atît, la organismele pluricelulare, mecanismelor de reglare celulară li se adaugă cele de homeostazie și reglare funcțională a organismului ca întreg, ceea ce complică mult izolarea, urmărirea și interpretarea fenomenelor.

Aceste cercetări au demonstrat că bacteriile, ca orice organisme vii, se află în permanență într-o stare de echilibru dinamic în care toate componentele lor sînt continuu construite și degradate. Ca urmare, compoziția chimică a celei depinde de natura, și viteza relativă a reacțiilor chimice care au loc în ea. Aceste procese chimice evoluează însă nu la întîmplare, ci în mod coordonat, în raport cu necesitățile din fiecare moment ale celei. Așa se explică de ce, cu toate că în reacțiile metabolice sînt implicați numeroși metaboliți intermediari, diferiți, numai foarte puțini

dintre ei se acumulează în exces, în așa fel încît să fie decelabili în mediul de cultură. Astfel, funcționarea armonioasă a tuturor mecanismelor fiziologice celulare face ca în condiții normale nici o proprietate să nu se manifeste în mod anarhic și nici o structură să nu dobîndească o preponderență nejustificată de economia ansamblului. A devenit foarte evident că, bacteriile sintetizează unele enzime necesare pentru utilizarea anumitor compuși numai cînd aceștia sau analogii lor sînt prezenți în mediu și că prezența în mediu a unor produși finali are drept urmare blocarea căilor metabolice care le asigură sinteza. Aceasta demonstrează că, deși celula posedă întreaga informație genetică, asigurînd potențialul ei specific de biosinteză, ea nu exprimă fenotipic decît cîte o parte a acestui potențial, în funcție de condițiile mediului și de starea ei fiziologică. Genele nu funcționează, deci, toate simultan și continuu pentru a determina concomitent sinteza tuturor proteinelor codificate în structura lor, deoarece aceasta ar duce la perturbări foarte grave ale metabolismului celular, antrenînd alterarea echilibrului intern al celulei.

Diferența dintre genotipul celulei (potențialul fiziologic total al bacteriilor, indiferent de procesele care se manifestă efectiv) și fenotipul ei (suma globală a proceselor active la un moment dat) reflectă intervenția mecanismelor de reglare. Selectivitatea exprimării fenotipice a potențialităților genotipice de sinteză implică existența unor mecanisme de reglare fină, care să declanșeze sau să blocheze sinteza anumitor tipuri de proteine. Importanța capacității de reglare, a naturii și nivelului biosintezei proteice este ușor de apreciat dacă se ține seama de faptul că, cele mai multe proteine celulare au funcții enzimatic implicate în metabolismul energetic, în sinteza tuturor constituenților celulari, inclusiv a celor macromoleculari (glucide, lipide, proteine), precum și în replicarea materialului genetic. Aceasta face ca sinteza enzimelor să reprezinte o treaptă esențială în metabolismul celular, întrucît de ea depind toate celelalte proprietăți ale celulei. Toate sintezele celulare sînt deci reglate, după cum este deja evident, grație controlului intern exercitat de materialul genetic și în funcție de semnalele de ordin fizico-chimic ale mediului extern. În consecință, celula bacteriană prezintă permanent o mare variație în ceea ce privește numărul de proteine-enzime, ceea ce denotă o deosebită suplețe a mecanismelor metabolice care le asigură sinteza, mecanisme capabile să intre în acțiune, în mod selectiv, pe măsura necesităților imediate ale celulei.

Watson (1970, 1976) apreciază la $\sim 10^6$ numărul moleculelor de proteine prezente într-o celulă de *E. coli*. Numărul tipurilor diferite de molecule prezente simultan în aceeași bacterie este mai greu de stabilit. Teoretic, Watson, bazat pe numărul probabil al enzimelor necesare pentru a satisface exigențele de creștere ale unei celule cultivate pe glucoză, ca unică sursă de C și energie, apreciază numărul proteinelor diferite la minimum 600—800/celulă. Numărul copiilor în care se găsesc aceste proteine variază în limite foarte mari în raport cu natura și funcția lor. Unele, cum sînt cele ale căii glicolitice, sînt formate în număr aproximativ fix (fiecare în $\sim 10^5$ copii), altele, în număr foarte variabil, în funcție de natura nutrienților prezenți în mediu. În cantități mari se găsesc, alături de enzimele implicate în primele trepte de degradare a glucozei, și cele care asigură sinteza aminoacizilor, a nucleotidelor, a ATP, precum și proteinele structurale din constituția peretelui celular, a membranei citoplasmatică

etc. Cele care produc coenzimele se găsesc în cantități foarte mici. Numărul proteinelor ribosomale variază foarte mult. În celulele care cresc rapid, ribosomii reprezintă ~25–30% din masa celulară, în timp ce după oprirea creșterii, numărul lor scade sub 20% din cifra maximală. Numărul copiilor celor 50 de proteine ribosomale oscilează în funcție de aceste variații ale structurilor din care fac parte. În mod similar oscilează și numărul enzimelor implicate în catabolismul unor substanțe utilizate pentru creștere. Astfel, în cazul β -galactozidazei, în prezența lactozei în mediu, ca unică sursă de C și energie, numărul moleculelor de enzimă este de ~3 000/celulă de *E. coli*, iar în absența acesteia, de numai 2–3. În felul acesta, mecanismele de reglare asigură fiecărei celule nu numai ansamblul corespunzător de molecule enzimatice, ci și cantitățile necesare.

În lumina datelor actuale, celula bacteriană apare ca un sistem integrat de macromolecule specifice, biologice active, caracterizat printr-o perfectă ordine funcțională, rezultând din interferențe complexe între activitatea de „programare” a materialului genetic, procesele „efectoare” ale metabolismului celular și mecanismele de „control” care dirijează biosinteza. La rîndul său, metabolismul este rezultatul interacțiunii dintre enzime și substratul nutritiv furnizat de mediu. Strînsa interdependență a tuturor componentelor celulare și integrarea lor într-un sistem unitar se datorează faptului că în celula bacteriană normală toate moleculele active lucrează în armonie, deoarece fiecare dintre ele „știe” ce are de făcut și ce fac celelalte, primește mesaje chimice și ascultă de ele și, în același timp, se supune unui dublu control exercitat, pe de o parte, de informația codificată în materialul genetic, iar, pe de altă parte, de factorii variabili ai mediului extern. De aceea, două celule genetice identice pot avea fenotipuri deosebite — în sensul de a elabora enzime diferite și în cantități diferite în funcție de caracteristicile deosebite ale mediilor respective de viață.

Mecanismele de reglare reprezintă deci un sistem de coordonare în care se integrează într-un tot unitar; a) selecția adecvată în raport cu mediul a informației genetice care urmează a fi exprimată fenotipic și care nu poate reprezenta decît o parte din totalul informației păstrate și transmise ereditar de genom de la o generație la alta; b) procesele de „transcriere” a acestei informații în vederea sintezei proteinelor după „programul” codificat în gene; c) realizarea cantitativ echilibrată a acestei sinteze și d) desfășurarea reacțiilor implicînd activitatea catalitică a proteinelor sintetizate. Genomul bacterian depozitează, prin urmare, sub formă codificată, nu numai planul arhitectural detaliat de structură a celulei, ci și programul ei de activitate funcțională coordonată, ca și informația necesară funcționării unor mecanisme de control capabile să asigure efectuarea adecvată, în raport cu cerințele mediului, a tuturor proceselor fiziologice.

După Kleinsmith (1976), funcția mecanismelor de reglare se poate exercita la patru nivele, cu sensibilitate diferită (fig. 281): 1) nivelul cel mai puțin sensibil, dar în același timp cel mai important deoarece implică decizia blocării sau formării ARNm este cel al transcrierii genetice; 2) controlul la nivelul traducerii genetice este mai impresionant; 3) modificarea directă a activității enzimelor existente în celule reprezintă nivelul de control cel mai sensibil și cel mai prompt; 4) degradarea proteinelor.

În funcție de mecanismele lor moleculare și de efectele acestora, procesele de reglare pot fi grupate în două mari categorii:

1) *Reglarea pozitivă* corespunde situației în care exprimarea informației genetice este crescută cantitativ în prezența unei molecule specifice de reglare. Ea necesită intervenția unui inductor și a produsului genei de reglare (activator), iar, în unele cazuri, prezența AMPc și a proteinei CAP, pentru inițierea transcrierii genetice. Acest mod de reglare este tipic în cazul operonului *ara*, care codifică enzimele necesare pentru utilizarea arabinozei.

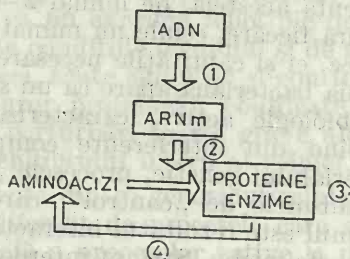


Fig. 281. — Cele patru nivele la care pot acționa mecanismele de reglare a activităților celulei bacteriene.

2) *Reglarea negativă* corespunde proceselor în care, în prezența moleculei de reglare, exprimarea informației genetice este diminuată cantitativ (Clarke, 1972). Un exemplu este cel al inducției sintezei enzimelor de către substratul asupra căruia acționează (produsul genei de reglare, proteina-represor, împiedică genele să se manifeste în absența inductorului) și represia sintezei enzimelor prin produsul final (tabelul nr. 38, 39).

Tabelul nr. 38

Efectele reglării pozitive și negative ale exprimării genelor

Condiția de mediu	Rata exprimării genelor	
	Reglare pozitivă	Reglare negativă
Prezența moleculei de reglare	Crescută	Diminuată
Absența moleculei de reglare	Diminuată	Crescută

Importanța studiilor de mutagenезă pentru descifrarea mecanismelor de reglare. Utilizarea mutațiilor de reglare („regulatory mutation”, Demain, 1972), avînd ca sediu una din regiunile de reglare a cromosomului bacterian (și nu o genă structurală cum este cazul obișnuit) a permis lămurirea unor aspecte esențiale ale mecanismelor de reglare.

Au fost izolate mutante de *E. coli*, care sintetizează β -galactozidaza, enzimă normal inductibilă în absența inductorului. Astfel de mutante, numite constitutive, aparțin la două clase: 1) *mutantele de reglare i^-* , care, în funcție de natura leziunii ADN, nu produc represor sau produc un represor nefuncțional și 2) *mutantele de reglare O^c* , la nivelul regiunii operator, care devine nefuncțională, datorită pierderii capacității de a lega proteinele-represor. Mutantele de reglare din aceste categorii produc proteine,

Comparație între sistemele de reglare cu control pozitiv și negativ (după Strickberger, 1976)

Proteine de reglare	Control negativ		Control pozitiv	
	Represor		Activator	
	Operator		Inițiator	
Situsul de reglare pe ADN	Împiedică transcrierea genei		Permite transcrierea genei	
Rolul proteinei de reglare	Sistem inductibil	Sistem represibil	Sistem inductibil	Sistem represibil
Molecula efector	Inductor	Corepresor	Inductor	Corepresor
Rolul moleculei efector	Împiedică funcția represorului	Stimulează funcția represorului	Stimulează funcția activatorului	Împiedică funcția activatorului
Prezența moleculei efector	Permite transcrierea genelor	Împiedică transcrierea genelor	Permite transcrierea genelor	Împiedică transcrierea genelor
Pierderea situsului de legare a moleculei efector, ca rezultat al efectului mutației asupra proteinei de reglare	Sinteză neinductibilă (dominantă)*	Sinteză derepresată recesivă*	Sinteză neinductibilă (recesivă)	Sinteză derepresată (dominantă)
Efectul mutației care împiedică legarea proteinei de reglare de ADN (când mutația este în proteină : recesiv ; când mutația este în situsul de legare al ADN : dominant în poziția <i>cis</i> , recesiv în poziția <i>trans</i>)	Genele structurale sint transcrise		Genele structurale nu sint transcrise	
Efectul mutației care împiedică proteina de reglare să se elibereze de pe ADN (dominant)	Sinteză constitutivă	Sinteză derepresată	Neinductibil	Superrepresat
	Genele structurale nu sint transcrise (represia continuă)		Genele structurale sint transcrise (activarea continuă)	
	Neinductibil	Superrepresat	Sinteză constitutivă	Sinteză derepresată

* Mutațiile sint clasificate ca dominante sau recesive în funcție de comportarea lor în prezența unei gene de tip sălbatic, într-un mezigot.

independent de necesități, deoarece producerea constitutivă înseamnă lipsă de control. În cursul ei, proteinele respective (proteine constitutive) sînt formate în cantități fixe. Mutantele O^c pot fi relativ ușor deosebite de cele cu mutații în genele represor, măsurînd sinteza enzimei în celule parțial diploide (merozigot), care conțin două copii ale regiunilor cromosomale respective. Celulele care conțin două gene pentru proteina-represor (una funcțională și alta nefuncțională, modificată prin mutație) sînt încă represibile, pentru că moleculele de represor „bun” se pot lega de regiunea operator normală. În schimb, celulele care conțin un operator „rău” sînt totdeauna constitutive, pentru că nu permit legarea represorului.

Mutantele i^s superrepresor („superrepressor mutation”) împiedică sinteza enzimelor *lac*, chiar în prezența inductorului în mediu. Aceasta se explică prin faptul că inductorul (lactoza) poate inactiva efectul represorului normal produs de gena i^+ . Superrepresorul i^s însă continuă repressia în prezența lactozei, deoarece și-a pierdut situsul de legare pentru inductor. În felul acesta, sinteza enzimelor *lac* devine neinductibilă. Ullman și Monod (1967) au izolat mutante *lac*, care afectează nu inductibilitatea efectivă a operonului, ci nivelul de inducție, respectiv cantitatea maximă de enzimă produsă. Această comportare sugerează posibilitatea afectării capacității ARN polimerazei de a se lega de ADN, pentru a iniția transcrierea. Se consideră că, în general, mutațiile situate în amonte față de promotor permit legarea mai eficientă a ARN polimerazei (și producerea unei cantități mai mari de enzimă), în timp ce mutațiile în aval o leagă mai slab și, în consecință, determină producerea unei cantități mai mici de enzime.

Operonul

Sub denumirea de *operon*, Jacob și Monod (1961, 1963) au descris o unitate funcțională de reglare, alcătuită dintr-un grup de cistroni (A, B, C, D, E), care codifică, de regulă, funcții înrudite (ca, de exemplu, biosinteza enzimelor unei anumite căi metabolice) și este transcrisă ca o unitate, pentru a produce un ARNm policistronic. Reglarea coordonată a enzimelor codificate de operon este asigurată prin faptul că traducerea ARNm va produce în mod secvențial toate enzimele, începînd cu A, B pînă la E.

Cel mai mult studiat este operonul *lac*, care asigură codificarea și reglarea sintezei enzimelor ce intervin în metabolismul lactozei. Pe baza lui, Jacob și Monod (1961) au elaborat un model, devenit clasic, de structură a operonilor, care explică modul de reglare a acestor exprimări. Operonul *lac* este situat la 8 minute pe harta genetică a *E. coli* și are următoarea structură (fig. 282):

Genele structurale *z*, *y* și *a*, grupate adiacent în structura cromosomului, codifică structura celor trei enzime care asigură catabolismul lactozei, pe calea unui intermediar, ARN.

Gena *z* codifică β -galactozidaza, care catalizează hidroliza lactozei, și a altor β -galactozide, la glucoză. Produsul ei este un lanț polipeptidic

lung (g.m. $\sim 134\,000$ dal), care se combină cu alte trei lanțuri similare, pentru a forma enzima tetrameră.

Gena *y* codifică β -galactozid permeaza, proteină de membrană, activă în transportul dependent de consum de energie, ca și de acumularea în celulă a β -galactozidelor, a melibiozei și a rafinozei.

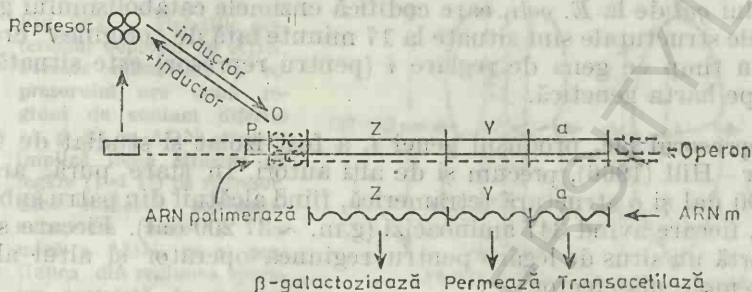


Fig. 282. — Schema operonului *lac* cu genele structurale. Z — 3-galactozidază; Y — galactozid permează; a — galactozid acetilază; P — promotor (situl de legare al ARN polimerazei); O — regiunea operator (regiunea de legare pentru represorul codificat de cistronul *i*). Legarea represorului de operator împiedică formarea de ARNm policistronic.

Gena *a* codifică tiogalactozid transacetilaza, care, după Gottschalk (1979), în mod normal, acetilează lactoza și alte β -galactozide cu ajutorul acetil-CoA. Deși sinteza ei este reglată în comun cu cea a primelor două enzime, nu are o funcție cunoscută în metabolismul celular. Deoarece determină acetilarea analogilor structurali nemetabolizabili ai lactozei, urmată de eliminarea lor, ea ar putea acționa ca o enzimă de detoxifiere a tiogalactozidelor (Birge, 1981). Este de asemenea, posibil ca funcția ei să nu fie esențială, deoarece mutațiile la nivelul genei *a* nu alterează semnificativ metabolismul lactozei la *E. coli*.

Rezultă că din cele trei gene structurale, numai una, gena *z*, codifică o enzimă implicată direct într-o cale metabolică.

Regiunea operator (o), situată în structura operonului adiacent genei *z*, nu este un cistron propriu-zis (Birge, 1981), deoarece nu codifică sinteza unui produs difuzibil. Are o lungime de ~ 27 pb (Maizels, 1973), și funcționează ca un situs de recunoaștere și legare pentru represorul specific al operonului. După Watson (1976), are, în esență, funcții negative. Când regiunea operator este liberă se inițiază transcrierea, care are loc prin regiunea O și genele structurale. Dacă este legată de represor, transcrierea este blocată.

Regiunea promotor (p) este situată între regiunea O și cistronul *i*. În cazul operonului *lac*, are o lungime de ~ 80 pb și două regiuni funcționale distincte: 1) regiunea de interacțiune cu ARN polimeraza, implicată în legarea inițială a acesteia și 2) situsul de legare al proteinei CAP („catabolite activation protein”), sau CRP, localizat, distal față de operator. El are proprietatea de a lega complexul AMP-CAP.

Cistronul *i* codifică proteina-represor cu rol-cheie în reglarea biosintezei proteinelor. După Harper (1977), exprimarea genei *i* este normal constitutivă, fiind funcțională la o rată constantă pentru a forma subunitățile represorului *lac*. Datorită acestui fapt, în condiții normale, în absența lactozei din mediu, cele trei enzime codificate de genele structurale *z*, *y* și *a* sînt sintetizate numai în cantități extrem de mici. La unii operoni, cistronul *i* este situat la distanță de genele structurale. Astfel, în cazul operonului *gal* de la *E. coli*, care codifică enzimele catabolismului galactozei, genele structurale sînt situate la 17 minute față de „originea” cromosomului, în timp ce gena de reglare *i* (pentru represor) este situată la 61 minute pe harta genetică.

Represorul *lac*, produsul genei *i*, a fost izolat și studiat de Gilbert și Muller—Hill (1966), precum și de alți autori. În stare pură, are g.m. ~150 000 dal și o structură tetramerică, fiind alcătuit din patru subunități identice, fiecare avînd 347 aminoacizi (g.m. ~37 200 dal). Fiecare subunitate poartă un situs de legare pentru regiunea operator și altul alosteric pentru o moleculă-efector.

În mod normal, represorul *lac* funcțional tetrameric este prezent în celulele de *E. coli* în cantități foarte mici (cîteva molecule/celulă (Cohen, 1976) sau ~10—20 copii per ficcare cromosom (Stickberger, 1976). Cu artificii de tehnică, însă cantitatea de represor poate fi crescută de la 0,002% la 2,5% din proteina totală, ceea ce corespunde la cîteva grame de represor/kg de celule. Mutantele hiperproductive sînt foarte utile în cercetările care vizează izolarea, purificarea și studiul activității represorului. Izolat în stare pură, represorul *lac* are o foarte mare afinitate pentru situsul specific din ADN. Dovada o constituie faptul că jumătate din capacitatea sa maximă de legare de regiunea operator este atinsă la o concentrație de represor de numai 10^{-13} M.

Bazele moleculare ale legării represorului de operator. Una din problemele controversate ale reglării genetice se referă la modul în care proteina-represor „găsește” și recunoaște o regiune-țintă de 27 pb între cele ~6 milioane de nucleotide ale cromosomului bacterian. Pentru a explica acest fenomen au fost elaborate mai multe modele și ipoteze.

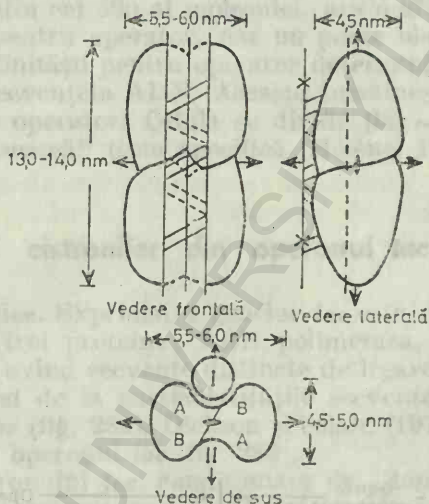
După modelul lui Cohen (1976), represorul ar fi o moleculă simetrică, cu forma de halteră și dimensiunile de $14,0 \times 6,0 \times 4,5$ nm. Legarea lui de regiunea operator (fig. 283) s-ar face plasîndu-se cu axul său longitudinal de-a lungul moleculei de ADN.

Consecințele acestui model sînt următoarele: 1) existența unei regiuni cu simetrie binară la nivelul situsului de legare pe operator; 2) posibilitatea ca cele patru subunități ale represorului să interacționeze simultan cu operatorul, acoperind o lungime de 14 nm din molecula de ADN; 3) fiecare subunitate a represorului trebuie să posede două suprafețe de contact (A și B în fig. 283) în regiunea operator.

După o altă ipoteză, represorul s-ar fixa slab, nespecific, pe o secvență oarecare a ADN, după care ar migra spre operator, fie prin salturi succesive de la un situs nespecific la altul, fie prin difuzie de-a lungul moleculei de ADN d.h. pînă cînd este „capturat” de operator.

Progrese deosebite referitoare la modul de legare a proteinei-represor de ADN au rezultat din cercetările lui Gilbert și Maxham (1973), precum și ale lui Dickson și colab. (1975), care au stabilit secvența completă a nucleotidelor în regiunea de reglare a ADN *lac*. Această secvență include sfârșitul genei de reglare *i* (ultimii cinci codoni terminali), întreaga regiune

Fig. 283. — Relațiile proteinelor represor cu ADN. Fiecare subunitate a represorului are două regiuni de contact diferite (A și B) cu ADN, ceea ce implică două situsuri de legare (I și II) pe represor. Sînt indicate schematic adîncitura mare și cea mică a ADN, ca și porțiunea din regiunea operator protejată de represor față de degradarea prin DNază. Ultima schemă corespunde datelor furnizate de microelectronografia (după Cohen, 1975).



promotor, regiunea operator și începutul genei z . Sfârșitul cistronului i este indicat, pe catena-sens a ADN, de prezența codonului-stop ACT (UGA pe ARNm), iar începutul genei z , de codonul-inițiator TAC, respectiv AUG pe ARNm (fig. 284). Analiza secvenței nucleotidelor evidențiază prezența în regiunile promotor și operator a unor secvențe cu simetrie binară, de tip 2 („twofold symmetry”), în care secvența perechilor de baze la stînga axului de simetrie este exact simetrică celor de la dreapta lui. În felul acesta, secvențele sînt „palindromice” deoarece nucleotidele din catena superioară, citite într-o anumită direcție, sînt aceleași ca și nucleotidele din catena inferioară, „citite” în direcție opusă.

Deși funcția exactă a secvențelor cu simetrie rotațională nu este cunoscută, există mai multe argumente care pledează pentru ideea că ele ar corespunde regiunilor ce pot fi „recunoscute” de proteinele cu conformație simetrică. Între acestea după Dickson (1975), sînt de menționat următoarele: 1) din punctul de vedere al economiei evolutive, proteina care participă într-o interacțiune simetrică cu ADN necesită numai jumătate din conținutul informațional, comparativ cu o interacțiune asimetrică cu un situs de recunoaștere a ADN cu mărime, specificitate și energie de legare similare; 2) secvențele simetrice permit unei proteine capabile de difuzie unidimensională de-a lungul moleculei de ADN să recunoască secvența simetrică din ambele direcții; 3) secvențele simetrice permit formarea, prin împerecheri intrăcatenare, a unor structuri cruciforme (fig. 285), care ar putea funcționa mai ușor în legarea proteinelor-represor tetramere decât formele lineare.

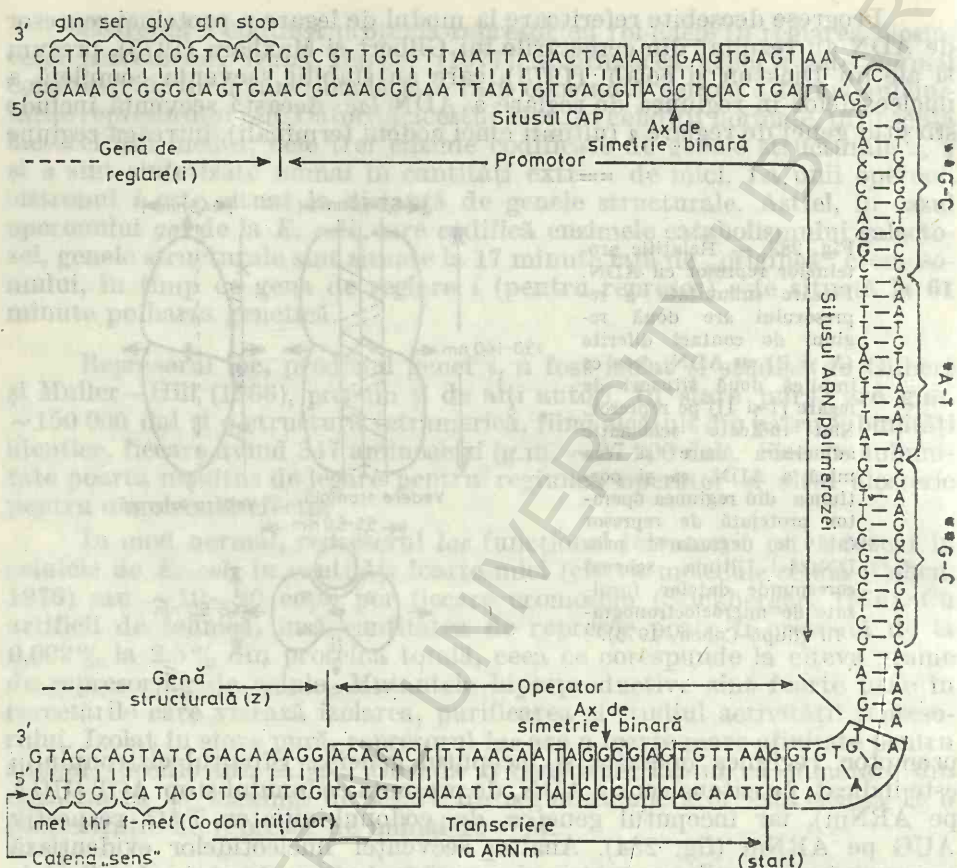


Fig. 284. — Secvențele nucleotidelor la nivelul situsurilor operator și promotor *lac* ale *E. coli*, incluzând sfârșitul genei de reglare *i* și începutul primei gene structurale a operonului (*Z*). Secvențele încadrate în dreptunghiuri au structură palindromică, A—T, regiune bogată în A—T; C—G, regiune bogată în C—G (după Dickson, 1975).

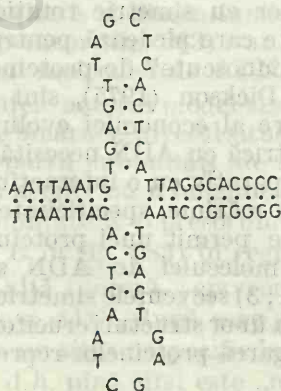


Fig. 285. — Structură „cruciformă” consecutivă producerii de bucle în ADN la situsul de legare CAP. Ea leagă mai ușor proteina represor tetramerică decît forma lineară a ADN.

Interacțiunea represor—operator este puternică și selectivă. Studiul proprietăților represorului *lac* a evidențiat un principiu general de funcționare în lumea vie, în sensul că un sistem dat (în acest caz, cuplul represor-operator) este optimizat pentru un anumit tip de funcționare globală și nu „maximalizat” pentru o anumită reacție (ca, de exemplu, fixarea pe operator). Datorită acestei particularități, represorul mutant, având schimbat un aminoacid din cei 360 ai moleculei, are o afinitate de 100—10 mii de ori mai mare pentru operator, dar nu poate bloca exprimarea genelor *lac*. Creșterea afinității pentru operator determină mărirea afinității pentru oricare din secvențele ADN. Aceasta înseamnă deplasarea lui în căutarea situsului operator. Celula se divide (la ~20 min.) înainte ca represorul să-și „găsească” ținta specifică (Hélène, 1984).

Controlul exprimării cistronilor din operonul *lac*

Inițierea transcrierii genetice. Exprimarea genelor *lac* este controlată de interacțiunea specifică cu trei proteine: ARN polimeraza, proteina CAP și represorul *lac*, fiecare având secvențe distincte de legare în regiunile promotor-operator. Pornind de la particularitățile secvenței nucleotidice a regiunilor de reglare *lac* (fig. 284), Dickson și colab. (1975) au elaborat următorul model pentru operonul *lac* (fig. 286).

Inițierea transcrierii operonului *lac*, condiționată de „deschiderea” moleculei de ADN d.h. și de formarea complexului de inițiere, necesită existența unei secvențe specifice care să permită recunoașterea și dematurarea stimulată de ARN polimerază. O regiune din promotorul *lac* pare să

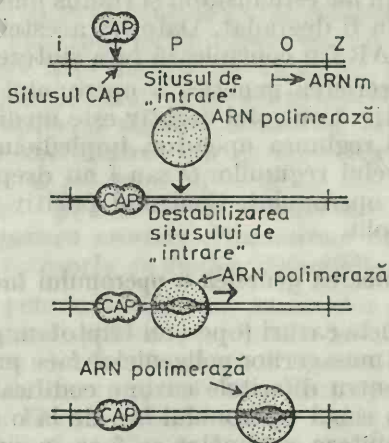


Fig. 286. — Modelul de inițiere a transcrierii în operonul *lac* (după Dickson, 1975).

îndeplinească ambele condiții. Astfel, regiunea bogată în A—T, cu secvența repetată CTTTA, ar reprezenta situsul de intrare al ARN polimerazei, în timp ce proteina CAP (CRP) ar facilita formarea complexului „deschis” la situsul de intrare. Dickson și colab. (1975) au demonstrat că situsul de intrare este mărginit de ambele părți de secvențe care conțin o

mare proporție de baze de tip G—C (10—12 perechi de baze de o parte și 9—15 de cealaltă). Regiunea bogată în G—C ar avea rolul de a stabili molecula dublu helicală, opunându-se formării de complexe „deschise”. Proteina CAP legată de situsul de interacțiune ar avea rolul de a destabiliza regiunea bogată în G—C situată în vecinătatea acestuia. Ulterior, regiunea bogată în G—C ar funcționa ca un transductor (engl. „transducer”), transmitând efectul legării proteinei CAP la situsul de intrare al ARN polimerazei, respectiv la o distanță de ~ 14 pb. Funcția „transductorului” G—C în promotor ar fi aceea de a ține situsul de intrare bogat în A—T „închis”, în absența legării proteinei CAP, permițând prin aceasta represia prin catabolit. Procesul de transmitere la distanță a acestui efect a fost denumit de Burd și colab. (1975), *telestabilitate*.

După formarea complexului deschis la situsul de intrare, ARN polimeraza inițiază transcrierea, începând de la situsul „start”, descris de Maizels (1973). Este greu de explicat de ce transcrierea nu începe cu situsul de intrare, ci cu un situs-start situat la o distanță de ~ 35 pb. Ulterior, ea suferă o deplasare spre situsul-start, care — după cum am arătat — nu coincide cu situsul de intrare. Această deplasare s-ar putea realiza fie printr-o mișcare de translație (Blattner, 1972), fie printr-o mare modificare conformațională a enzimei. ARN polimeraza se leagă strins la situsul-start, protejind $\sim 40-45$ pb de digestia cu DNază (Pribnow, 1975).

Transcrierea operonului *lac* duce la formarea unei molecule de ARNm complementar catenei externe a ADN din fig. 284 (catena — „sens”). Sinteza sa are loc în direcția $3' \rightarrow 5'$, începând de la punctul start. Rezultă o moleculă de ARNm poligenic sau policistronic (g.m. $\sim 1,7 \times 10^6$ dal), care conține mai multe semnale „start” pentru inițierea traducerii genetice, fiecare marcat, probabil, de un codon AUG. Ca orice ARNm bacterian, ARNm *lac* este instabil și tradus numai de un număr mic de ribosomi, înainte de a fi degradat. Datorită acestei particularități, numărul moleculelor de ARNm controlează rata sintezei proteinelor pe care le codifică.

Transcrierea genetică a operonului *lac* este controlată atât pozitiv, cât și negativ. Controlul negativ este mediat de represorul *lac*, care se leagă specific de regiunea operator, împiedicând transcrierea. De aceea, mutațiile la nivelul regiunilor *O* sau *i* au drept rezultat sinteza constitutivă a produșilor operonului. Controlul pozitiv este exercitat pe calea represiei prin catabolit.

Traducerea genetică a operonului *lac*

În unele cazuri (operonii triptofan, galactoză, histidină de la *E. coli*), traducerea mesagerilor poligenici se face prin sinteza unor cantități echimoleculare pentru diferitele enzime codificate de genele structurale ale operonului. În cazul operonului *lac*, de la o singură moleculă de ARNm poligenic, biosinteza enzimelor se face în proporția de $1 : \frac{1}{2} : \frac{1}{5}$, corespunzător β -galactozidazei, permeazei, respectiv acetilazei. Această comportare particulară sugerează că în inițierea traducerii codonii-start AUG situați de-a lungul moleculei de ARNm poligenic ar avea o eficiență diferită, asigurând legarea de ribosomi cu frecvență diferită. Această particularitate reprezintă, ea însăși, o modalitate de reglare, deoarece permite sinteza diferențiată a enzimelor operonului, în funcție de nevoi. Un număr egal de

molecule ar fi necesar numai dacă viteza de turnover a proteinelor individuale ar fi egală și dacă activitatea specifică a proteinelor individuale înrudite ar fi identică, ceea ce în realitate nu se întâmplă cel puțin în acest caz.

Inducția sintezei enzimelor

„O proprietate fundamentală a celulelor vii este capacitatea lor de a comuta genele de la starea de „stop” la cea de „start”, ca răspuns la semnale extracelulare”

T. MANIATIS

M. PTASHNE

Numeroase fapte de observație au demonstrat că foarte multe gene din structura cromosomului bacterian sînt nefuncționale în anumite perioade. Astfel, genele structurale care codifică biosinteza multor enzime sînt normal inactive în absența substratului respectiv: producerea enzimei este represată. Cînd substratul este adăugat în mediu, gena devine funcțională și odată cu aceasta este inițiată sinteza enzimelor. Acest fenomen este cunoscut sub denumirea de *inducție* sau *derepresie*. Fenomenul a fost descris inițial de Duclaux (1899), drept capacitatea microorganismelor de a utiliza pentru creștere anumite substraturi numai după o perioadă de expunere la acțiunea lor.

Inițial, a fost considerat ca un proces de adaptare enzimatică, vizînd o mai bună adaptare la mediu. Karstrom (1938) a dat denumirea de *enzime adaptative* acelor enzime care apar în echipamentul enzimatic al unei bacterii numai dacă aceasta este cultivată pe un mediu care conține substratul specific corespunzător, spre a le deosebi de *enzimele constitutive* a căror sinteză este permanentă, independent de prezența sau absența substratului în mediu. În prezent, inducția sintezei enzimelor este definită ca procesul de inițiere a sintezei unei enzime sau de creșterea relativă a vitezei acestei sinteze, ca rezultat al prezenței în mediu a unei substanțe — cu funcție de substrat inductor — pe care celula trebuie să o degradeze în compuși mai simpli necesari pentru creștere. Numeroase enzime care participă în catabolism intră în categoria *enzimelor inducibile*.

Inductorii sînt substraturi pentru activitatea enzimelor respective (amidonul pentru amilază, zaharoza pentru invertază, lactoza pentru β -galactozidaze etc.) Unii dintre ei sînt foarte puternici putînd să crească sinteza enzimelor de peste 1000 de ori (respectiv mai multe procente din proteina celulară totală). Monod, Hognes și Cohn (1953, 1955), lucrînd cu $^{35}\text{SO}_4^{2-}$; precum și Spiegelman și Rotman (1954), lucrînd cu ^{14}C -lactat, au demonstrat că inducția enzimatică este rezultatul sintezei *de novo* a enzimei respective în prezența substratului. Inducția enzimatică a fost studiată în amănunțime în legătură cu β -galactozidaza de la *E.coli*. Majoritatea tulpinilor acestei specii și anume cele aparținînd tipului genetic *lac⁺* (sălbatic) au proprietatea de a folosi lactoza ca unică sursă de C și energie. La aceste tulpini, diglucidul este introdus în celulă în special de un sis-

tem de transport activ, constind dintr-o proteină specifică, β -galactozid permează (fig. 287). Apoi lactoza este hidrolizată la glucoză și galactoză de enzima β -galactozidază (fig. 290).

În mod normal, în absența lactozei din mediu, β -galactozidaza este prezentă în celulele de *E. coli* în cantități atit de mici (1-2 molecule/celulă)

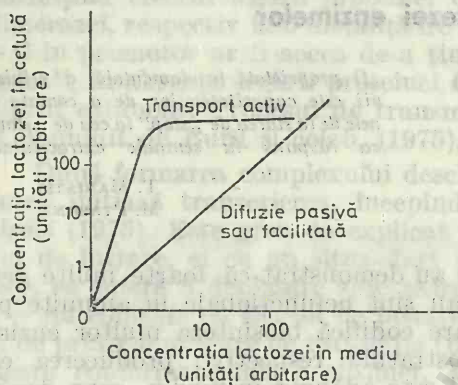


Fig. 287. — Concentrația intracelulară a lactozei la *E. coli*, în funcție de concentrația sa în mediu și de natura mecanismului de transport (după Gottschalk, 1979).

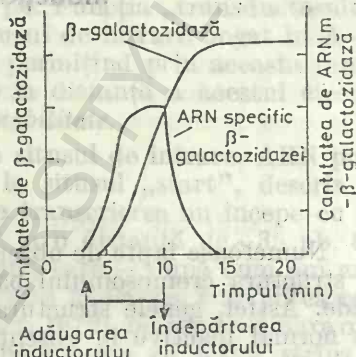


Fig. 288. — Creșterea și scăderea rapidă a ARNm pentru β -galactozidază, după adăugarea și respectiv după îndepărtarea inductorilor specifici. Cultivarea *E. coli* s-a făcut la 37°C (celulele se divid la fiecare 40 min.).

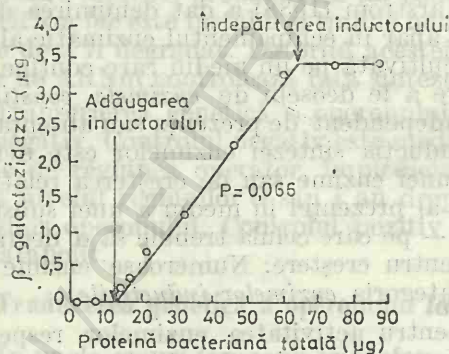


Fig. 289. — Cinetica sintezei induse a β -galactozidazei exprimată în funcție de creșterea masei celulare, într-o cultură de *E. coli*, (după Jacob și Monod, 1961).

încît nu este detectabilă decît cu tehnici speciale. După 3-4 minute de la adăugarea glucozei în mediu (fig. 288), sinteza β -galactozidazei crește progresiv, ajungînd pînă la 3000 molecule/celulă ($\sim 3\%$ din proteina totală). În această fază, fiecare celulă de *E. coli* conține ~ 35 -50 de molecule de ARNm- β -galactozidază (fig. 289).

În cazul bacteriilor la care prin artificii de tehnică s-a realizat o amplificare genică se poate observa o supersinteză de β -galactozidază (pînă la $\sim 15\%$ din proteina totală). Aceste celule cresc prost și tind să fie înlocuite treptat de celule cu sinteză echilibrată.

Mecanismul molecular al inducției enzimatice

După cum s-a demonstrat, cînd lactoza este prezentă în mediu, o cantitate foarte mică pătrunde chiar în absența permeazei în celulă, unde este convertită la alolactoza, care are funcția efectivă de inductor. Alolactoza (α -D-galactozil- β -1,6-D-glucoză) este un izomer al lactozei (α -D-galactozil- β -1,4-D-glucoză). Ea se formează de la lactoză printr-o reacție de transglicozilare (deplasarea legăturii glicozidice de la C₄ la C₆ în ciclul galactopiranozid), catalizată de cantitățile foarte mici de β -galactozidază prezente în mod normal în celulele neinduse (fig.290).

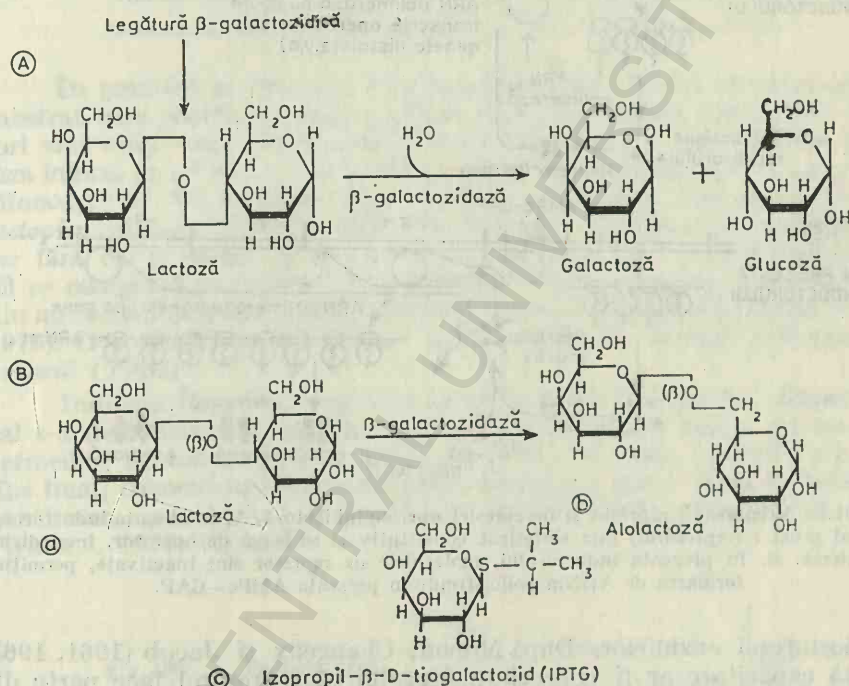


Fig. 290. — A. Hidroliza lactozei la galactoză și glucoză sub acțiunea β -galactozidazei. B. Structura chimică a lactozei (a), alolactozei (b) și moleculei de izopropil β -D-tiogalactozid (c) (IPTG).

După modelul lui Jacob și Monod (1963), referitor la structura și funcția operonului *lac*, în mod normal, în absența lactozei din mediu, proteina represor, produs al genei *i* este legată de regiunea operator și nu permite ARN polimerazei să se lege de regiunea promotor. Cînd lactoza (sau alt inductor) este prezentă în mediu, alolactoza se leagă de represorul atașat de operator și îl inactivează prin pierderea afinității sale pentru operator. Devenit inactiv, represorul se detașează de operator, care rămîne liber. ARN polimeraza se poate lega de ADN inițiind biosinteza ARNm și traducerea acestuia în cele trei enzime ale operonului: β -galactozidaza, permeaza și acetilaza. Derepresia operonului *lac* și sinteza enzimelor permit utilizarea lactozei ca unică sursă de C și energie.

Rolul represorului *lac*. Studiile *in vitro* și *in vivo* au arătat că represorul *lac* de tip sălbatic este capabil să oscileze între două stări alternative: 1) legarea de regiunea operator *lac* și blocarea funcționării constitutive a genelor *lac* în absența inductorului din mediu; 2) legarea sa cu inductorul și conversia la starea de represor inactiv, urmată de induc-

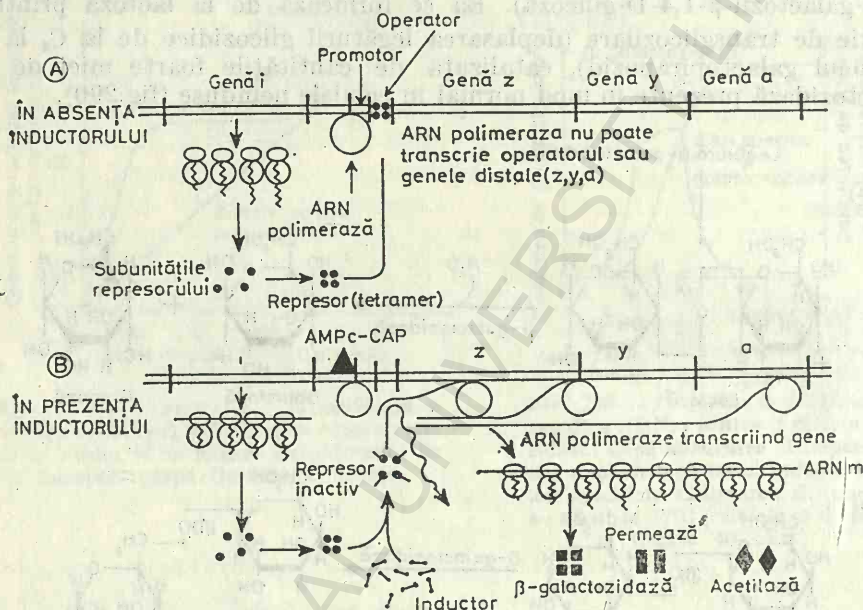


Fig. 291. — Mecanismul represiei și derepresiei operonului lactoză. A. În absența inductorului, produsul genei *i* (represorul) este sintetizat constitutiv și se leagă de operator, împiedicând transcrierea. B. În prezența inductorului, moleculele de represor sînt inactivate, permițînd formarea de ARNm policistronic în prezența AMPc—CAP.

ția biosintezei enzimelor. După Monod, Changeux și Jacob (1961, 1963) această capacitate ar fi consecința faptului că represorul face parte din categoria proteinelor alosterice. În acest caz, represorul de tip sălbatic ar avea două situsuri active: unul care se leagă de ADN *lac* și altul capabil să se lege de inductor. Cînd inductorul este absent, represorul este legat de situsul de legare pe ADN și sinteza enzimelor este blocată. Invers, cînd inductorul este prezent, el se leagă de represor și transformă situsul de legare pe ADN într-o formă nefuncțională, permițînd sinteza ARNm și inducția (derepresia) sintezei enzimelor (fig. 291).

Particularitățile inducției enzimatice la *E. coli*

Sistemul de inducție enzimatică *lac*, ca și altele de același tip, nu este riguros specific. El poate fi indus și de melibioză și rafinoză, de o serie de analogi ai substratului normal, ca și de unele substraturi sărace sau inactive pentru enzimă sau/și pentru metabolismul bacteriei respective (tabelul nr.40).

Tabelul nr. 40

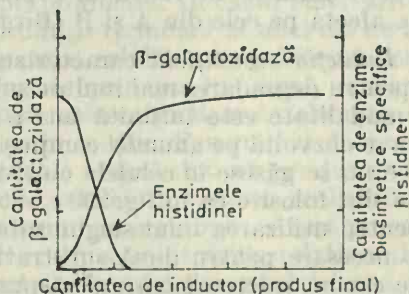
Exemple de analogi puternici inductori ai unor enzime

Enzima	Substratul inductor normal	Inductorul analog
β -galactozidaza	Lactoza	Izopropil- β -lactoza- -D-tiogalactozid
Penicilinaza	Benzil-penicilina	Meticilina
Maleat-cis-trans-izomeraza	Acidul maleic	Acidul malonic
Alifatic amidaza	Acetamida	N-metilacetamida

În practică se folosește inducția operonului *lac* cu ajutorul oricărui substrat care poartă un radical galactozidic în poziția α sau β . Unii inductori sînt chiar nemetabolizabili (nehidrolizabili) de către enzime și sinteza indusă nu aduce nici un avantaj celulei-gazdă, fiind aparent „gratuită” (Monod, 1951). Un exemplu binecunoscut este cel al *izopropil- β -D-tiogalactopiranozidului* (IPTG), analog al lactozei, capabil să inducă operonul *lac* fără ca el însuși să fie substrat degradabil pentru β -galactozidază. El se comportă ca un inductor „gratuit”, deoarece concentrația sa în mediu nu se modifică nici după mai multe generații succesive de celule (Cohen, 1976). O comportare similară au și moleculele de *tiometil- β -D-galactopiranozid* (TMG).

Inducția nu este un răspuns de tipul „totul sau nimic”. Experimental s-a demonstrat că pentru necesități intermediare există un nivel intermediar de concentrație a enzimelor. Ca și în cazul represiei prin produs final, concentrația intracelulară a enzimelor poate varia în funcție de cantitatea de inductor (respectiv de produs final) prezentă în mediu (Watson, 1977) (fig. 292).

Fig. 292. — Variația cantitativă a enzimelor per celulă, în funcție de cantitatea de inductor (respectiv de produs final) prezent în mediul de creștere (după Watson, 1976).



Tipurile de inducție a sintezei enzimelor

Au fost descrise două mecanisme diferite de inducție enzimatică:

1) *Inducția coordonată sau generalizată*, caracteristică, în general, căilor catabolice scurte, în care inductorul declanșează practic sinteza simultană a tuturor enzimelor căii. Ea este întâlnită la *E. coli* în cazul ope-

ronilor *lac* și *arabinoză*, ca și în cazul enzimelor necesare pentru conversia la glucozo-1-fosfat a galactozei formată sub acțiunea β -galactozidazei (fig. 293).

Cistronii reglați coordonat sînt situați grupat, adiacent unul față de celălalt. Ei au o orientare definită în operon, respectiv o anumită polaritate

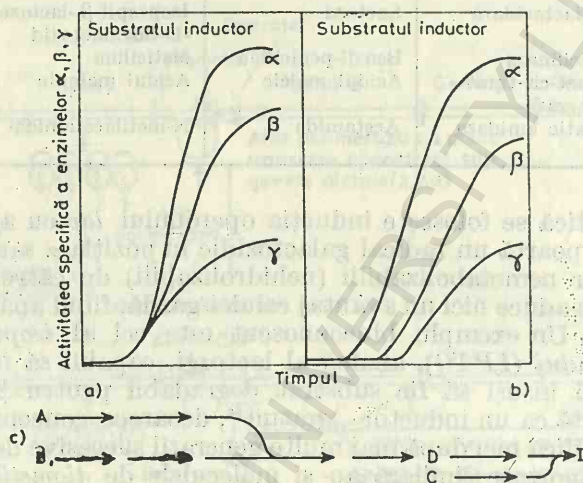


Fig. 293. — {Reprezentarea schematică a mecanismelor de inducție coordonată (a) și secvențială (b) a enzimelor α , β și γ . (c) Inducția secvențială acționează în căile catabolice lungi, care servesc pentru degradarea mai multor substraturi (după Gottschalik, 1979).

demonstrabilă prin proprietățile mutațiilor polare. Acest tip de mutații nonsens au drept efect pierderea funcției a doi sau mai mulți cistroni. Astfel, în cazul unui operon care include cistronii A, B, C, D și E, o mutație polară în A poate reduce sau chiar suprima funcția cistronilor B, C, D și E, în timp ce o mutație în cistronul C poate anula funcțiile cistronilor D și E, fără a afecta pe cele din A și B (Birge, 1981).

2) *Inducția secvențială* caracterizează căile catabolice lungi, care servesc pentru degradarea mai multor substraturi. După Gottschalk (1979), această modalitate este întâlnită într-o formă tipică la *Pseudomonas putida*, care se dezvoltă pe anumiți compuși aromatici, utilizând un set de zece enzime ce nu se găsesc în celulele cultivate pe alte substraturi. Dacă substraturile sînt folosite ca în fig. 293 c, este evident că unele enzime sînt necesare pentru utilizarea unui singur substrat (A, B sau C), în timp ce altele sînt necesare pentru două substraturi, iar altele pentru toate patru. În aceste cazuri, microorganismul răspunde inițial la inductor prin sinteza primei enzime, necesară pentru utilizarea lui. Intermediarul format, ca produs al acestei reacții induce sinteza unei a doua enzime, cu formarea altui intermediar, care, la rîndul său, induce sinteza enzimei următoare a căii. Această comportare este, în multe cazuri, consecința faptului că genele structurale pentru enzimele unor căi catabolice ramificate pot fi localizate pe cromosom sub forma a 2–3 sau mai multe unități funcționale, care sînt „comutate” din poziția *stop* în poziția *start* de inductorii corespunzători.

Enzimele constitutive. Studiul biosintezei enzimelor bacteriene a arătat că, în unele cazuri, exprimarea unor gene este constitutivă. În aceste cazuri, informația genetică este exprimată cu o rată mare, în absența oricărui semnal specific de reglare, iar cantitatea proteinelor respective nu pare să fie influențată de mediul extern. Un exemplu tipic este cel al enzimelor care asigură utilizarea glucozei la *E. coli*, al căror nivel intracelular nu se modifică semnificativ, indiferent dacă glucoza este adăugată sau eliminată din mediu.

După Watson (1977), cantitatea de proteine sintetizate constitutiv reflectă interacțiunea a patru factori esențiali: 1) viteza cu care poate fi sintetizată o moleculă de ARNm ca o funcție a secvenței promotor (în absența represorilor și a regiunilor operator); 2) viteza cu care ribosomii se leagă de punctul start al ARNm; 3) viteza cu care este citit mesajul genetic; 4) durata de viață a ARNm utilizat ca matriță. Enzimele inducibile pot deveni exprimate constitutiv prin mutații, care duc la pierderea sau alterarea represorului sau la modificarea regiunii operator.

Represia sintezei enzimelor

Represia enzimatică reprezintă fenomenul de scădere a vitezei de sinteză a unei enzime sau a unui grup de enzime, metabolic înrudite, ori chiar de oprire a elaborării lor, ca urmare a prezenței în celulă a unui metabolit cu rol de represor. Acest metabolit este reprezentat de produsul final al unei secvențe anabolice sau un analog al acestuia (Vogel, 1957). Enzimele din această categorie sînt denumite *enzime represibile*. După cum este știut, *E. coli* cultivată pe un mediu minimal cu glucoză, ca unică sursă de C și energie, sintetizează toți monomerii necesari pentru formarea macromoleculelor pe căile metabolice normale. Ca urmare, aminoacizii, nucleotidele și ceilalți monomeri sînt sintetizați în cantități corespunzătoare nevoilor, pentru a evita supraproducția. În cazul cultivării pe medii complexe, prezența fiecăruia din produșii terminali ai unei căi de biosinteză în mediu reprezintă un semnal pentru celulă, care printr-un fenomen de feedback * negativ, adică de represiie prin produs final, oprește sinteza enzimelor devenite inutile, întrucît microorganismul folosește cu precădere metabolitul existent ca atare în mediu. Fenomenul de represiie prin feedback are loc și în condiții naturale atunci cînd un produs de biosinteză este format în exces față de nevoile celei, în vederea realizării unei stări de echilibru între producția și consumul de metabolit. Acest proces permite celulelor să mențină în limite adecvate concentrațiile relative ale moleculelor necesare pentru sinteza proteinelor, acizilor nucleici etc. și pentru creștere, efectuînd o economie globală în metabolismul celular.

Represia sintezei enzimelor a fost descrisă pentru prima oară de Monod și Cohen—Bazire (1953) la *E. coli* (tipul sălbatic) cultivată pe medii minimale. În cazul adăugării unui anumit aminoacid în cantitate suficientă,

* Termenul *feedback*, tradus de obicei prin *retroacțiune*, conexiune inversă, retrocuplaj aferențiativ inversă etc., este folosit frecvent în forma originară, deoarece se consideră că nici una dintre expresiile citate nu redă integral sensul termenului inițial.

celulele recoltate după 4–5 generații sau extractele lor conțin o cantitate mult mai mică din enzimele implicate în biosinteza aminoacidului respectiv. Astfel, concentrația metionin-sintetazei apreciată prin cantitatea de L-metionină sintetizată pe oră și pe mg de azot bacterian, la 37°C, este de 450 ng în absența aminoacidului și de numai 4 ng (respectiv 99% față de martor) în prezența a 6 mM de D–L metionină.

Gorini și Maas (1958), studiind reglarea sintezei ornitin-transcarbamilazei — una din enzimele implicate în biosinteza argininei — au confirmat existența acestui fenomen. Prezența argininei în mediu, în faza exponențială de creștere a unei culturi de *E. coli* determină încetarea imediată a sintezei enzimei. Moleculele de enzimă prezente în celule în momentul instalării represiei se diluează exponențial în cursul dezvoltării ulterioare a culturii. Dacă celulele represate sînt spălate și introduse într-un mediu lipsit de arginină, sinteza ornitin-transcarbamilazei este reluată. Procesul este riguros specific, în sensul că adăugarea argininei nu influențează conținutul celulelor în enzime care nu au legătură cu biosinteza acestui aminoacid.

Fenomenul de represie enzimatică, prin care viteza sintezei enzimelor este reglată în funcție de concentrația produsului final al căii respective în celulă, a fost descris în legătură cu căile de biosinteză a mai multor aminoacizi, purine, pirimidine etc. La bacterii, toate enzimele unei anumite căi sînt cel mai adesea reglate împreună, fie că genele structurale sînt adiacente unele față de altele, ca în cazul operonilor histidină, leucină, triptofan etc., fie că sînt aranjate în mai multe grupuri sau au localizări diferite pe cromosom (arginină).

Represia prezintă uneori diferențe de ordin cantitativ. Astfel, în prezența argininei, sinteza fiecărei enzime a căii respective de biosinteză la *E. coli* este represată în grade diferite (fig. 284). În opoziție cu aceasta,

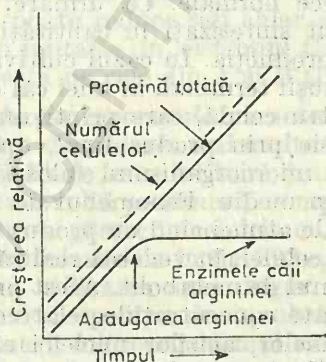


Fig. 294. — Represia enzimelor implicate în sinteza argininei prin adăugarea acesteia în mediul de cultură. Rata de sinteză a proteinelor totale rămâne neschimbată.

în cazul triptofanului, cînd concentrația acestui aminoacid în mediu depășește o anumită limită, sinteza fiecăreia din cele cinci enzime ale operonului este redusă la un nivel similar. Fenomenul este cunoscut sub denumirea de *represie coordonată* („coordinate repression”). Represia sintezei enzimelor nu este limitată la procese în care efectorul este produsul final al căii anabolice. Sinteza multor enzime poate fi represată de produși cu gre-

utate moleculară mică asociați direct cu reacțiile catalizate de enzimele respective. În cazul unor aminoacizi ca histidina, valina etc. agentul activ este un derivat al ARNt.

Mecanismul molecular al represiei enzimatice

Represia este cel mai mult studiată în raport cu căile de biosinteză a aminoacizilor (Hélène, 1984). Când aminoacidul lipsește din mediu, regiunea operator este liberă și sinteza de ARNm are loc în mod normal. În prezența aminoacidului, sinteza ansamblului enzimelor, căii respective este reglată de o proteină *aporepresor* inactivă separat, datorită lipsei totale de afinitate pentru regiunea operator. În prezența produsului final al căii (adăugat în mediu sau acumulat prin biosinteză endogenă), *aporepresorul* este activat: moleculele specifice de produs final, cu greutate moleculară mică, se comportă ca un *corepresor*.

Activarea *aporepresorului* s-ar datora modificării structurii sale de suprafață, ca urmare a combinării cu *corepresorul*. El suferă o modificare de tipul tranziției alosterice, devenind astfel un represor activ capabil să se lege de operator, blocându-l și împiedicând transcrierea genetică a operonului. Represia prin produs final stopează sinteza enzimelor după un scurt interval de timp, deoarece ARNm are viață scurtă. În momentul în care metabolitul din mediu este consumat, represorul lipsit de *corepresor* redevine *aporepresor* inactiv: regiunea operator este deblocată, represia este abolită, ceea ce permite intrarea în activitate a operonului și reinițierea biosintezei enzimelor implicate în formarea metabolitului respectiv.

Semnificația represiei enzimatice. Existența represiei prin feedback demonstrează că pentru rațiuni economice celula bacteriană dispune de mecanisme care reglează concentrația enzimelor anabolice. Datorită acestor mecanisme, viteza activității unei secvențe specifice biosintetice este reglată de mărimea rezervei produsului final în celulă: când rezerva crește, viteza de sinteză a enzimelor diminuează până la stopare; când rezerva scade, viteza sintezei enzimelor este accelerată. Funcționarea acestui mecanism este favorizată de faptul că și genele căilor anabolice sunt organizate în unități de funcționare și reglare coordonată, de tipul operonilor. Represia enzimatică reprezintă un mecanism eficient de stopare a sintezei endogene a intermediarilor biosintetici, atunci când aceștia sunt accesibili dintr-o sursă externă. În felul acesta, economia făcută de celulă în utilizarea sursei principale de C și energie poate fi orientată în direcția biosintezei de constituenți celulari.

Aplicațiile represiei enzimatice în biotehnologie

Cunoașterea mecanismului molecular al represiei prin feedback a permis punerea la punct a mai multor modalități de creștere substanțială a biosintezei anumitor enzime. După Demain (1972) cele mai importante sunt următoarele:

- 1) Limitarea prezenței și acumulării produșilor finali în mediu. Producerea de glutamat dehidrogenază poate fi mărită de ~20 de ori la *Bacillus licheniformis*, prin utilizarea glucozei sau malatului ca sursă de C, în loc de glutamat sau hidrolizat de cazeină.

2) Limitarea producerii *interne* prin biosinteză a produsilor finali, prin adăugarea în mediu a unui inhibitor al căii metabolice (tabelul nr. 41).

Tabelul nr. 41

Derepresia sintezei unor enzime biosintetice prin adăugarea de inhibitori al căii metabolice respective (după Demain, 1972)

Inhibitorul	Enzimele derepresate	Amploarea creșterii
2-tiazolalanină	Zece enzime ale căii de biosinteză a histidinei	30 ori
Indol-3-propionat	Triptofansintetaza	5 ori
Psicofuranină	Inozin 5'-monofosfat dehidrogenaza	5 ori
Adenină	Patru enzime ale căii de biosinteză a tiaminei	5—10 ori
β -cloralanină	Enzimele căilor de biosinteză a valinei și izoleucinei	2—7 ori

3) „Înfometarea” parțială a unei mutante auxotrofe cu produsul final necesar pentru creștere (tabelul nr. 42).

Tabelul nr. 42

Derepresia sintezei unor enzime biosintetice prin furnizarea limitată de substanțe necesare unor bacterii auxotrofe (după Demain, 1972)

Nevoia auxotrofă	Enzimele derepresate	Amploarea creșterii
Histidină	Zece enzime ale căii de biosinteză a histidinei	25 ori
Leucină	Acetohidroxiacid sintetaza	40 ori
Tiamină	Patru enzime ale căii de biosinteză a tiaminei	1 500 ori
Biotină	7-oxo-8-aminopelargonat aminotransferaza	400 ori

4) Utilizarea unui derivat al produsului final folosit foarte lent în metabolism. S-a demonstrat, spre exemplu, că prin cultivarea unei bacterii auxotrofe pentru uracil pe un mediu cu acid dihidro-ototic se mărește aproape de 1 000 de ori sinteza aspartat transcarbamilazei (până la ~7% din proteina totală).

5) Utilizarea de mutante de reglare (mutante constitutive) obținute pe două căi : 1) mutante care produc un aporepresor incapabil să se combine cu corepresorul ; 2) mutante la nivelul regiunii operator care nu pot lega represorul. Ele produc constitutiv enzime chiar în prezența unor concentrații de produși final normal represoare. Selecția lor se realizează curent datorită rezistenței lor la analogi toxici ai produsului final (tabelul nr. 43).

Tabelul nr. 43

Producția derepresată a enzimelor de către mutantele constitutive rezistente la analogii produșilor finali (după Demain, 1972)

Analogul	Enzimele derepresate	Amploarea creșterii
Trifluorleucină	Enzimele căii de biosinteză a leucinei	10 ori
Canavanină	Enzimele căii de biosinteză a argininei	30 ori
Etionină	S-adenozil metionin sintetaza	20 ori
	Cistationil sintetaza	120 ori
	Cistionaza	40 ori
5-metiltryptofan	Enzimele căii de biosinteză a tryptofanului	150 ori

Inhibiția activității enzimelor

Unul dintre mecanismele utilizate frecvent de celulele bacteriene pentru a împiedica cu promptitudine supraproducția de intermediari cu greutate moleculară mică (aminoacizi, baze purinice și pirimidinice etc.) este inhibiția activității enzimelor. Acest proces este cunoscut sub diferite denumiri ca: *inhibiția prin produs final*, *retroinhibiția* sau *inhibiția prin feedback*. Dacă celulele bacteriene ar dispune pentru reglarea biosintezelor numai de mecanisme de represie enzimatică, răspunsul lor adecvat la o modificare a mediului constind din creșterea concentrației lui într-un metabolit final nu ar fi foarte prompt. Enzimele deja prezente în celulă și-ar continua activitatea de sinteză și astfel ar avea loc acumularea în exces a produsului respectiv. Această sinteză neeconomică este prevenită prin intervenția concomitentă a unui mecanism de reglare fină, a cărei acțiune, de astădată instantanee, constă în inhibarea sau blocarea funcționării primei enzime a căii biosintetice respective, sub acțiunea produsului final aflat în exces.

Unele observații mai vechi au sugerat existența acestei căi datorită răspunsului extrem de rapid la adăugarea în mediu a unui produs final. Astfel, s-a demonstrat în cazul *E. coli* cultivată pe un mediu minimal că după adăugarea unui aminoacid marcat radioactiv acesta furnizează imediat practic totalitatea moleculelor aminoacidului respectiv în structura proteinelor nou sintetizate. Fenomenul implică stoparea (inhibarea) imediată a sintezei endogene a aminoacidului respectiv. Datorită existenței proceselor de transport activ, efectul acesta persistă până când aminoacidul adăugat ajunge la o concentrație foarte joasă în mediu ($\sim 1 \mu\text{g/ml}$), ceea ce demonstrează marea eficiență a efectului de economie a nutrienților adăugați.

În mod similar, Gorini (1959) a demonstrat că la anumite concentrații de arginină adăugate în mediul de cultură, sinteza argininei în celulele de *E. coli* poate fi redusă (inhibată), deși nivelul cantitativ al enzimelor care fac această sinteză rămâne neschimbat, adică același ca în mediul minimal. Aceasta demonstrează existența inhibiției, nu însă și a represiei

biosintezei enzimelor, care are loc numai după adăugarea unor cantități mai mari de arginină. În cazurile în care concentrația metabolitului în mediu poate fi urmărită rapid prin măsurători, se constată că efectul inhibitor al produsului final adăugat poate fi evidențiat în câteva secunde (fig. 295).

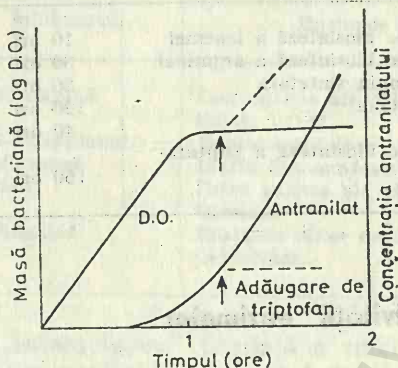


Fig. 295. — Efectul triptofanului asupra acumulării de antranilat de către o tulpină auxotrofă pentru triptofan, blocată imediat după antranilat. Cultura începe să acumuleze antranilat în mediu, imediat după ce creșterea încețază din cauza lipsei de triptofan (liniile continue). Liniile întrerupte arată comportamentul unei culturi în care s-a adăugat 1 μ g triptofan/ml.

Aceste date sugerează, după cum remarcă Davis și colab. (1969) că produsul final inhibă direct și imediat *activitatea* unei enzime a căii și nu sinteza ei. Faptul că efectul acestei acțiuni influențează *activitatea tuturor* intermediarilor demonstrează că inhibiția are loc la nivelul primei enzime a căii.

Un exemplu tipic de biosinteză reglabilă prin retroinhibiție îl constituie producerea L-izoleucinei la *E. coli* (Umbarger, 1957, 1961). Sinteza acestui aminoacid este efectuată pornind de la L-treonină, printr-o serie de cinci etape metabolice succesive, catalizate de cîte o enzimă specifică (fig. 296). Dacă o tulpină de *E. coli* cultivată pe un mediu minimal

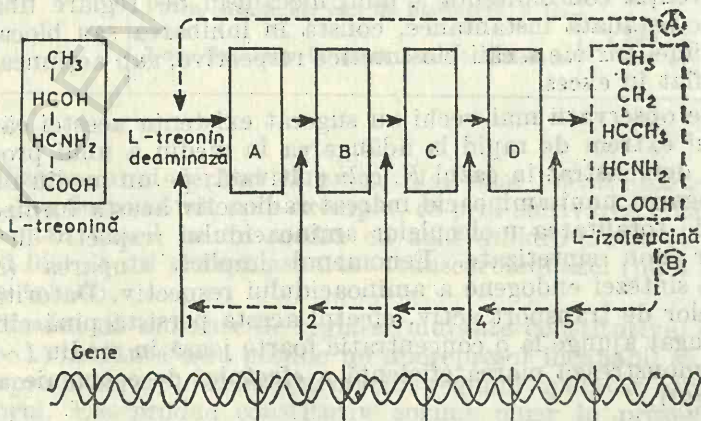


Fig. 296. — Biosinteza L-izoleucinei pornind de la treonină. Acumularea izoleucinei în mediu prin biosinteză sau prin adăugare, din afară determină inhibarea activității L-treonin-deaminazei, care catalizează prima treaptă a procesului de biosinteză (după Watson, 1977).

cu glucoză este aprovizionată exogen cu L-izoleucină, prezența acestui aminoacid în mediu blochează activitatea enzimei implicate în prima treaptă a biosintezei *L-treonin-deaminaza* și, astfel, α -cetobutiratul, produsul de reacție al acestei enzime nu se mai formează. În felul acesta, celelalte enzime corespunzătoare reacțiilor 2, 3, 4 și 5 din lanțul metabolic respectiv, care acționează fiecare asupra metabolitului rezultând din activitatea enzimei precedente, sînt lipsite de produșii intermediari care reprezintă substratul lor specific. În consecință, activitatea întregii căi este redusă sau blocată.

Existența reglării prin retroinhibiție a fost demonstrată pentru mai multe sisteme enzimatice bacteriene în care biosinteza unor metaboliți sau degradarea unui substrat se realizează întotdeauna printr-o serie de trepte metabolice succesive, catalizate fiecare, de către o enzimă diferită. La modul general, grupul de enzime răspunzător de sinteza sau de degradarea unui anumit metabolit, deci de o anumită secvență de reacții, este denumit *zimon*. Toți membrii unui zimon lucrează în armonie: o enzimă acționează asupra produsului activității enzimei precedente, iar activitatea fiecărei enzime în parte depinde de activitatea tuturor enzimelor zimonului. Prezența în mediu a produsului final al ultimei trepte metabolice de sinteză inhibă activitatea enzimei care catalizează prima treaptă a biosintezei și, prin aceasta, întreaga serie de reacții succesive este blocată, ea putînd fi pusă din nou în acțiune numai atunci cînd metabolitul respectiv lipsește. Din aceasta derivă și desemnarea acestui mecanism de reglare prin denumirile de *inhibiție prin produs final*, *retroinhibiție* sau *inhibiție prin feedback*, aplicate toate aceluiași fenomen, cunoscut încă și sub denumirea de *efectul Novick-Szilard*.

Mecanismul molecular al inhibiției prin produs final

Inhibiția prin feedback este realizată datorită caracterului de proteină alosterică a enzimelor care inițiază anumite căi metabolice. Ca urmare, ele interacționează atît cu substratul, cît și cu produșii finali ai căii respective, care au forme mult diferite de substrat. Cînd se combină cu produsul final al căii (*efectorul alosteric*), ele sînt incapabile să funcționeze catalitic, deoarece situsul activ suferă o tranziție alosterică la forma inactivă. În felul acesta, întreaga serie de reacții ce duce la formarea produsului final este inhibată.

Tipurile de inhibiție prin produs final. Pînă în prezent au fost descrise mai multe tipuri de retroinhibiție:

1) *Inhibiția simplă* corespunde căilor metabolice implicate în sinteza unui singur produs final. Are ca exemplu caracteristic calea de formare a izoleucinei de la treonină.

2) *Inhibiția căilor multifuncționale*, mult mai complexă, corespunde situației în care se produce mai mulți produși finali. În acest caz, prezența unor enzime reglate independent permite o inhibiție fracționată, selectivă, a activității totale.

3) *Inhibiția cooperantă* descrisă la *E. coli* în biosinteza purinei, implică o acțiune inhibitorie complexă asupra primei enzime a căii glutamin-fosforilpirofosfat amidotransferaza.

4) *Inhibiția cumulativă*, caracteristică pentru glutaminsintetaza de la *E. coli*, este consecința faptului că glutamina servește ca donator al grupării amino în biosinteza triptofanului, acizilor adenilic, și citidilic, glucozamin-6-fosfatului, histidinei și carbamilfosfatului. Fiecare produs final poate inhiba parțial activitatea sintetazei. Gradul de inhibare realizat de diferitele combinații de produși finali este cumulativ, deoarece activitatea reziduală este produsul activităților fracționate, determinate de inhibitorii individuali. Spre exemplu, dacă sînt testați, fiecare în parte, triptofanul, acidul citidilic, carbamilfosfatul și acidul adenilic, au activitățile de 0,84; 0,86; 0,87 și 0,59. Cînd sînt prezente în combinație, activitatea reziduală și totală este $0,84 \times 0,86 \times 0,87 \times 0,59 = 0,37$. Inhibiția cu efect cumulativ reprezintă o modalitate particulară de reglare a concentrației diferiților metaboliți, prin acțiunea produșilor unei enzime multifuncționale, care modulează activitatea enzimelor-cheie.

Inhibiția prin produs final prezintă o serie de diferențe importante față de represie:

1) Represia afectează toate enzimele căii de biosinteză, în timp ce inhibiția (exceptînd căile ramificate) afectează direct numai enzima care catalizează prima reacție a căii.

2) În cazul aminoacizilor, represia necesită conversia la aminoacil ARNt (*represori indirecți*; Davis și colab., 1969), în timp ce funcția de inhibare este directă și se manifestă instantaneu, chiar în cazul enzimelor purificate.

3) Cele două mecanisme sînt afectate de mutații diferite (în situsuri diferite). În celula bacteriană, cele două procese sînt asociate, efectele lor completîndu-se reciproc.

Inhibiția prin pseudofeedback. În general, mecanismele de reglare a activităților celulare au o mare specificitate față de metaboliții normali, necesară pentru a minimaliza perturbările care ar putea lua naștere cînd semnalele chimice endogene ar acționa pe receptori „răi”. După Davis, Dulbecco și colab. (1969), în cazul unor compuși care nu au fost obiectul unei selecții evolutive, specificitatea nu este atît de mare. De aceea, mecanismele de reglare pot fi înșelate, așa cum pot fi enzimele cu analogii metaboliților. S-a demonstrat astfel că 5-metiltriptofanul inhibă creșterea *E. coli*, făcînd celula să înceteze biosinteza triptofanului, de care are nevoie pentru creștere pe mediu minimal-glucoză, mimînd efectul inhibitor prin feedback al aminoacidului natural.

Această *inhibare prin pseudofeedback* poate fi eliminată printr-o mutație care alterează enzima sensibilă. Enzimele modificate în acest mod sînt adesea rezistente atît la stimulul fals, cit și la cel natural.

Mutantele insensibile la inhibiție pot fi utilizate în laborator sau în biotehnologie pentru creșterea concentrației intracelulare și excreția unor cantități mărite de produși finali utili.

Controlul coordonat al activității celulare

Existența a două procese de control prin feedback corelate funcțional — retroinhibiția și represia enzimatică prin produs final — a fost demonstrată la *E. coli* în legătură cu sinteza L-izoleucinei.

Adăugarea în exces în mediu a acestui aminoacid radioactiv determină în primul rând, inhibarea activității L-treonin-deaminazei, enzimă care catalizează prima etapă din lanțul reacțiilor de biosinteză a L-izoleucinei, apoi blocarea sintezei tuturor enzimelor anabolizante prin care se realizează biosinteza aminoacidului în celula bacteriană. Cantitatea de aminoacid prezent în mediu sau sintetizat de celulă acționează, în cazul represiei, ca un semnal de control: creșterea concentrației lui peste un anumit nivel îi stopează biosinteza. Așa cum nivelul temperaturii dintr-un termostat reglează, prin retrocontrol, un sistem de încălzire, declanșând sau oprind intrarea în funcție a sursei de căldură, nivelul de concentrație a L-izoleucinei în celulă exercită un control de tip feedback negativ asupra producției lui, determinând oprirea sintezei tuturor enzimelor necesare anabolismului L-izoleucinei.

Sub raportul determinismului lor genetic, cele două mecanisme de control prin feedback sînt distincte, în sensul că sînt susceptibile de variație independentă: unele mutante pierd numai capacitatea de a inhiba activitatea enzimelor, deci metabolismul lor nu mai poate fi reglat prin retroinhibiție, în timp ce altele devin incapabile să stopeze însăși producția de enzime, adică sînt private de aptitudinea de reglare prin represie; mutațiile respective au de altfel sedii diferite pe cromosomul bacterian.

Dacă în exemplul citat, procesele de represie și retroinhibiție s-ar limita la zimonul care coordonează sinteza L-izoleucinei, ar fi de așteptat ca în celulă să se producă o acumulare de L-treonină, precursorul acestei sinteze. Fenomenul nu are totuși loc în realitate, deoarece L-treonina (aminoacid cu funcție de precursor direct în sinteza proteinelor, deci el însuși produs final al unui lanț de reacții anabolice) declanșează, la rîndul său, prin concentrația intracelulară la care ajunge, un fenomen de feedback similar, care acționează asupra propriilor reacții de biosinteză ș.a.m.d. Astfel, toate căile anabolismului, indiferent de complexitatea lor, se supun prin jocul acestor mecanisme unui sistem general de reglare.

Conceptul de proteină alosterică

Activitatea enzimelor poate fi inhibată de prezența unor compuși chimici, care o pot anula temporar (reversibil) sau definitiv (ireversibil). Acești compuși numiți *inhibitori* pot afecta situsul catalitic sau oricare altă regiune a moleculei de enzimă, influențînd astfel legarea substratului. Inhibiția activității enzimelor poate fi realizată prin mai multe mecanisme diferite.

1) *Inhibiția competitivă* este determinată de acțiunea inhibitorilor competitivi, substanțe avînd o anumită analogie structurală cu substratul normal al enzimei și, ca urmare, o anumită afinitate pentru situsul catalitic.

Un exemplu tipic, este cel al acidului malonic — inhibitor competitiv al succinat dehidrogenazei — care prezintă o asemănare structurală suficient de mare cu acidul succinic, ceea ce îi permite să se lege de situsul catalitic al enzimei.

2) *Inhibiția necompetitivă* este determinată de acțiunea inhibitorilor, care nu prezintă analogie cu substratul. Ei acționează asupra enzimei într-o regiune diferită de cea a situsului catalitic, asupra complexului enzimă-substrat sau, concomitent, asupra enzimei și complexului enzimă-substrat, cu formarea unor combinații inactive.

3) *Inhibiția alosterică* reprezentând o caracteristică a enzimelor alosterice, implică participarea unui situs diferit de cel catalitic, din structura enzimei, numit *situs alosteric*. Inhibiția alosterică joacă un rol deosebit de important în ansamblul diferitelor mecanisme de reglare și control metabolic.

Proteinele alosterice. Pentru a explica comportarea funcțională a proteinelor cu activitate de reglare, Monod, Changeux și Jacob (1961, 1963) au propus un model general de reactivitate moleculară, comun unui întreg ansamblu de sisteme de control metabolic, menit să explice modul de acțiune al acestora. În conformitate cu acest model, majoritatea enzimelor de reglare ar fi *proteine alosterice* (gr. *allos* = altul; *stereos* = spațiu). Proteinele alosterice au cel puțin două tipuri de situsuri de combinare stereospecifică diferite, capabile să lege anumite molecule mici. Situsul activ (catalitic) leagă substratul, în timp ce situsul alosteric este complementar față de structura unui alt metabolit, *efectorul alosteric*, de care se leagă specific și ireversibil. Formarea complexului enzimă-efector alosteric este urmată de o modificare reversibilă în structura moleculară a proteinei, *tranziția alosterică*, prin care situsul catalitic își modifică configurația, trecînd într-o formă inactivă (fig. 297). Invers, legarea substratului sau a

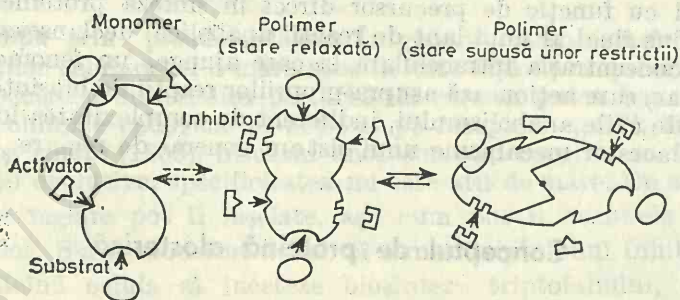


Fig. 297. — Modificările proteinelor alosterice în cursul proceselor de reglare (după Changeux, 1965).

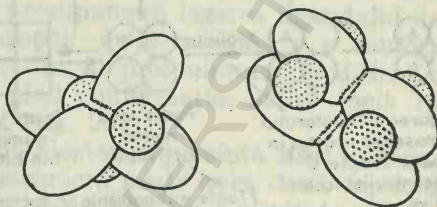
unui efector activator de situsul catalitic are un efect opus, favorizînd stabilirea unei configurații „active”, ceea ce determină manifestarea activității enzimatice.

Enzimele alosterice sînt totdeauna proteine cu greutate moleculară relativ mare, compuse din mai multe subunități. În unele cazuri, subunitățile sînt identice, fiecare avînd pe suprafață atît situsuri catalitice, cît

și situsuri alosterice. În altele, enzimele alosterice au două tipuri de subunități, dintre care unele poartă situsul catalitic, iar celelalte pe cel de reglare. Astfel, aspartat transcarbamilaza este formată din două tipuri de subunități: una activă enzimatic, iar cealaltă cu rol în reglare, purtând situsuri care leagă substanțele cu rol inhibitor.

Enzima intactă are două subunități catalitice și patru subunități mai mici, de reglare (fig. 298). Izolate, cele două tipuri de subunități se pot reagrega spontan, pentru a reface enzima activă, dotată cu proprietă-

Fig. 298. — Cele două modalități posibile de grupare a subunităților catalitice și de reglare ale aspartat transcarbamilazei. Subunitățile catalitice (în alb ~ 90 000 dal) apar alungite și îngustate în regiunea ecuatorială. Cele 4 subunități de reglare (punctat; ~ 30 000 dal) leagă fiecare câte două molecule de inhibitor (după Gerhart, 1964).



țile proteinelor alosterice (Gerhart, 1964). Enzimele alosterice au tendința de a fi localizate la punctele strategice de ramificare a căilor metabolice, în care activitatea lor poate controla viteza fluxului de metaboliți prin întreaga ramificație. În căile biosintetice, enzima care mediază prima reacție a unei secvențe specifice este alosterică. Activitatea ei este reglată prin acțiunea inhibitoare a produsului final.

Particularitățile enzimelor alosterice. Studiile referitoare la comportarea enzimelor alosterice au arătat că ele suferă tranziții „înainte” și „înapoi” între două configurații „normale”, una activă și alta inactivă. Prin interacțiune cu substratul, situsurile active par să fie forțate să treacă într-o stare conformațională activă, care permite efectuarea reacției enzimatică (modelul „adaptării induse”; „induced-fit model” al lui Koshland; fig. 299 A, Gottschalk, 1979). Modelul implică posibilitatea modificării afinității unui anumit situs activ pentru substratul său și tranziția, în funcție de modificarea conformațională suferită, în prezența acestuia, de la o stare cu afinitate mică la o stare cu afinitate mare.

O altă particularitate a activității enzimelor alosterice decurge din modelul lui Monod și colab., (1963), după care enzimele alosterice native sînt oligomere, alcătuite din mai multe subunități identice, avînd deci mai multe situsuri catalitice (active) și de reglare. Legarea la situsul activ a substratului, nu numai că determină activitatea catalitică, dar forțează situsurile active ale celorlalte subunități să treacă de la starea de afinitate scăzută la o stare de afinitate ridicată, stabilizînd astfel toate situsurile catalitice adiționale în configurația activă. Invers, legarea unui efecteur negativ la situsul alosteric al unei subunități, nu numai că ține situsul activ al acestei unități într-o stare de afinitate slabă, dar, în plus, împiedică tranziția situsurilor catalitice ale celorlalte subunități ale moleculei enzi-

matice, de la starea de mică afinitate la o afinitate ridicată. Acest mod de comportare decurge din interacțiunea cooperantă („cooperative binding”) a mai multor situsuri pentru stabilizarea acestei configurații. Ca o consecință a acestor interacțiuni, enzimele alosterice au o cinetică diferită

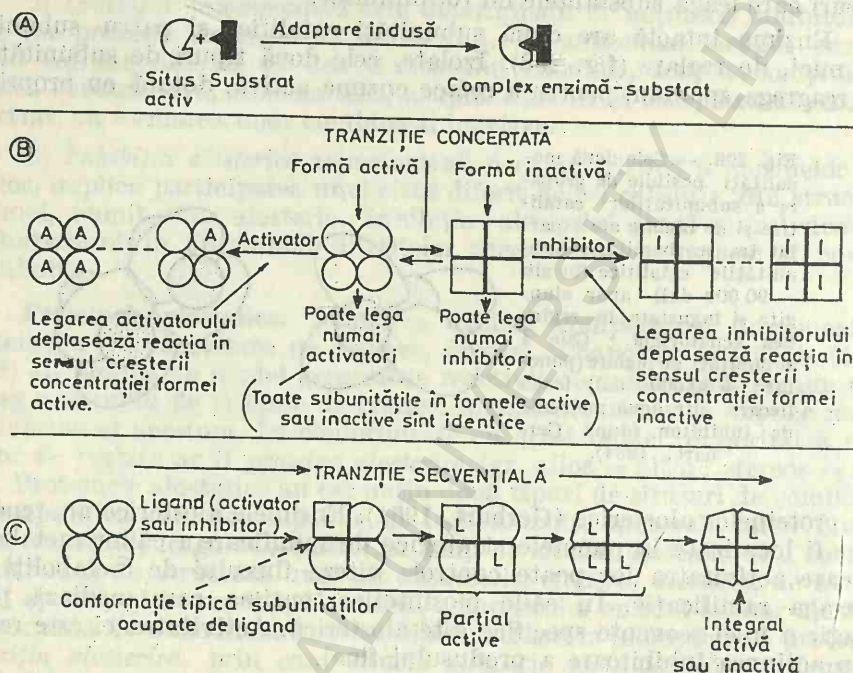


Fig. 299. — Tranziția alosterică (A) Modele de tranziție concertată (B) și secvențială a proteinelor alosterice (C).

de cea a enzimelor uzuale. Ea poate fi reprezentată printr-o curbă sigmoidă, spre deosebire de curba hiperbolică a cineticii enzimelor, postulată de teoria Michaelis—Menten.

Mecanismul molecular al tranziției alosterice. După Monod, Changeux și Jacob (1963), tranziția alosterică ar fi determinată de marea flexibilitate a proteinelor alosterice, însă modul în care legarea unui ligand (activator sau inhibitor) modulează activitatea enzimei este încă necunoscut. Nu se știe dacă modificările conformaționale sînt induse de legarea ligandului alosteric sau dacă apar spontan și sînt numai stabilizate de ligand.

Au fost propuse două modele valabile pentru proteinele alosterice oligomere, alcătuite din subunități (protomere) identice (un protomer este cea mai mică subunitate care posedă, cel puțin potențial, toate structurile necesare pentru a permite adaptarea liganzilor stereospecifici, ce se pot lega de enzima nativă).

Mecanismul tranziției concertate, propus de Monod și colab. (1965), presupune că simetria protomerilor este constant păstrată și că enzima oligomeră ar putea exista în două forme reversibile: forma T, în care toate

subunitățile se găsesc într-o stare de activitate scăzută, și forma R, în care toate au o activitate ridicată. Tranziția alosterică ar avea la bază modificarea spontană între diferite tipuri conformaționale. În situația cea mai simplă, corespunzând, spre exemplu, unui produs final care inhibă o enzimă, enzima ar avea două forme și anume una catalitic activă și alta inactivă. Ligandul inhibitor se leagă numai de forma inactivă a enzimei și deplasează echilibrul spre această formă a enzimei. Substratul sau efectorul pozitiv se leagă de forma activă și deplasează echilibrul spre activ (fig. 299).

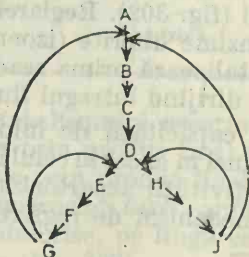
Mecanismul secvențial de tranziție alosterică, propus de Koshland (1966) și Kirtley și colab. (1967), presupune că legarea ligandului de unul din protomerii enzimei este însoțită de o modificare a conformației acestuia. Din cauza contactului strins al protomerului modificat cu cei adiacenți, aceștia își schimbă pe rând conformația, astfel încât își modifică afinitatea lor pentru ligand (fig. 299).

Conform acestui model enzima alosterică prezintă stări intermediare, în care, spre exemplu, o enzimă tetrameră poate avea două subunități cu o afinitate mare pentru substrat și altele două cu o afinitate slabă. Tranziția are loc secvențial, de la starea de afinitate slabă la starea cu afinitate parțial crescută, spre starea de afinitate ridicată. Un efecteur pozitiv va crește numărul subunităților în stare de afinitate ridicată, iar un efecteur negativ va scădea numărul acestora. Este, probabil, că ambele modele — bazate pe o serie de date experimentale — sau alte mecanisme, care le combină unele particularități, ar putea funcționa în anumite sisteme biologice, între care — evident — și cele reprezentate de microorganisme. După Stanier (1970), deși reglarea alosterică are loc totdeauna în căile biosintetice, ea nu este limitată la ele, putând acționa și în cele catabolice în special cind nu sînt supuse reglării prin inducție.

Reglarea căilor metabolice ramificate

Reglarea prin feedback a sintezei și activității enzimelor din căile biosintetice ramificate se realizează printr-un mecanism modificat. În astfel de căi, în care anumite reacții sînt comune, un singur substrat reprezintă materialul de plecare pentru formarea a doi sau mai mulți produși

Fig. 300. — Controlul prin feedback al activității enzimelor în căile de biosinteză ramificate. Producși finali, G și J, pot acționa prin inhibarea enzimei care catabolizează prima reacție comună ($A \rightarrow B$) sau prin inhibarea primei enzime din fiecare cale ramificată (după Pierce, 1980).



finali. Reglarea acestor căi se poate realiza sub acțiunea produsilor finali, fie prin inhibarea enzimei care catalizează prima reacție comună ($A \rightarrow B$ în fig. 300), fie prin inhibarea primei enzime din fiecare ramificație a căii

(fig. 300 D—E; D—H). Este evident că dacă reglarea s-ar realiza exclusiv la nivelul enzimei care catalizează reacția $A \rightarrow B$, supraproducția unuia din cei doi produși finali, spre exemplu a produsului G, ar putea restringe și sinteza celuilalt (J), deși celula nu a sintetizat suficient produs pentru a-și acoperi necesitățile metabolice.

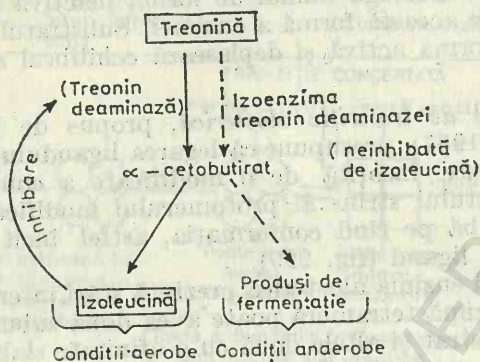


Fig. 301. — Metabolismul aerob și anaerob al treoninei la *E. coli*. Un exemplu de cale simplă ramificată.

Un exemplu caracteristic de cale metabolică ramificată simplă este cel al metabolismului treoninei la *E. coli* (fig. 301). În condiții aerobe, calea duce la formarea de izoleucină, produs final capabil să inhibe o singură enzimă, treonin deaminaza. În anaerobioză, metabolitul intermediar, α -cetobutiratul, este convertit la diferiți produși de fermentație. Acest proces este realizat prin intermediul unei izoenzime * a treonin deaminazei, care este însă insensibilă la acțiunea inhibitorilor a izoleucinei.

Controlul metabolismului aspartatului la *E. coli*. Prima cale metabolică ramificată în care s-a descris controlul prin enzime multiple este cea de sinteză a aminoacizilor din familia aspartatului (L-lizina, L-metionina, L-treonina și L-izoleucina) de la aspartat. Ea se realizează prin două mecanisme diferite, inhibiția prin feedback și represia prin produs final.

Inhibiția prin feedback este un proces complex, implicând intervenția unei serii de procese inhibitorii exercitate la mai multe situsuri specifice. Fiecare enzimă supusă reglării este localizată în așa fel încât inhibarea prin produs final a unei ramificații nu interferează cu fluxul reacțiilor în celelalte ramificații (fig. 302). Reglarea este făcută și mai subtil datorită existenței a trei enzime diferite (izoenzime) având funcția de aspartatkinază, enzima care catalizează prima reacție a căii, formarea de β -aspartil-fosfat de la aspartat, dirijând întregul flux al căii de biosinteză (tabelul nr. 44).

Datorită capacității de inhibare selectivă a unei căi metabolice, acumularea lizinei în exces în celula bacteriană determină numai o scădere moderată a activității aspartatkinazice, reprezentată de izoenzima sensibilă la acest mecanism de reglare. Celelalte aspartatkinaze care nu sînt

* Izoenzimele sînt forme moleculare multiple ale unei enzime. Deși au aceeași afinitate de substrat, catalizează aceeași reacție chimică și au originea în aceeași celulă, ele au configurații spațiale diferite și proprietăți fizicochimice și imunologice diferite, precum și comportare diferită față de inhibitori.

sensibile la inhibarea prin aminoacidul acumulat își continuă nestingherit activitatea. În schimb, în cazurile în care se acumulează concomitent și un exces de treonină (tabelul nr. 44) este suprimată cea mai mare parte din activitatea aspartatkinazică.

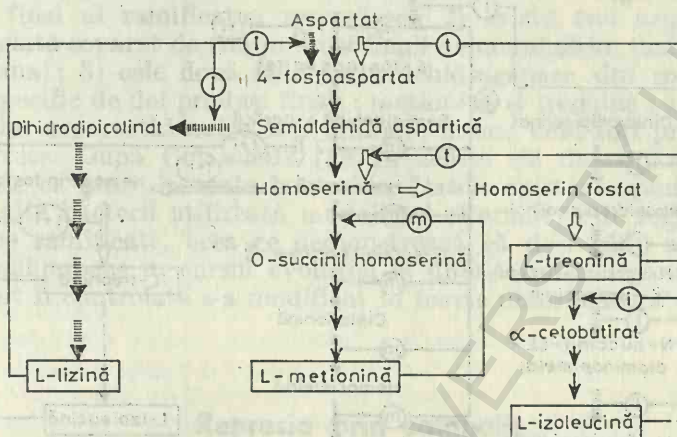


Fig. 302. — Inhibiția prin feedback a biosintezei aminoacizilor derivați de la acidul aspartic la *E. coli*. L-izoleucina inhibă treonindeaminaza; L-treonina inhibă aspartatkinaza I și homoserin-dehidrogenaza I; L-metionina inhibă O-succinil homoserin-sintetaza; L-lizina inhibă aspartatkinaza III și dihidropicolinat sintetaza (după Gottschalk, 1979).

Inhibiția prin produs final a metabolismului aspartatului poate fi anulată prin mutații, care afectează proprietățile alosterice ale enzimelor. Mutantele de acest tip sunt caracterizate prin supraproducția produsului final corespunzător.

Tabelul nr. 44

Controlul primei reacții din metabolismul aspartatului la *E. coli*

Enzima	Represată de	Inhibată de
Aspartatkinaza I	Treonină sau izoleucină	Treonină
Aspartatkinaza II	Metionină	—
Aspartatkinaza III	Lizina	Lizina

Represia prin produs final a metabolismului aspartatului la *E. coli*

Existența procesului de inhibiție prin produs final nu exclude existența unui control paralel prin represie prin produs final. Și acest tip de control este facilitat de prezența izoenzimelor care conferă caracterul de represie selectivă. La *E. coli* au fost descrise, pe lângă cele trei aspartatkinaze, două homoserin dehidrogenaze (fig. 303).

Studiul acestui mecanism de reglare a demonstrat că fiecare produs final are „enzima sa”, a cărei sinteză poate fi represată sau derepresată. Represia sau inhibiția totală a enzimelor căii este condiționată de prezența

în exces a tuturor produșilor finali. Celula poate recurge însă la represia bivalentă, trivalentă sau multivalentă, după cum sint implicați 2, 3 sau mai mulți produși (Gottschalk, 1979). Astfel, aspartatkinaza I și homo-

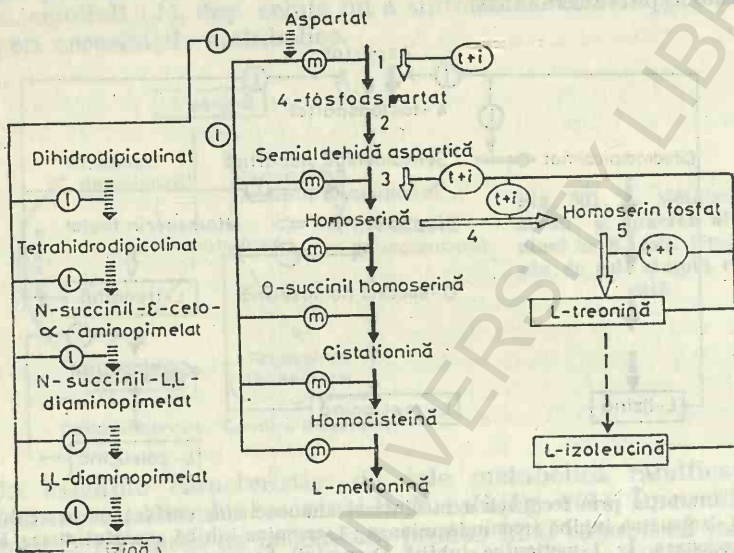


Fig. 303. — Represia prin produs final în calea de biosinteză a aminoacizilor derivați de la acidul aspartic, la *E. coli*. Enzimele marcate cu săgeți duble sint supuse represiei duble prin L-treonină și L-izoleucină. L-metionina reprezintă sinteza enzimelor indicate prin săgeți continue, iar L-lizina, pe cele cu săgeți întrerupte. Cheia enzimelor: 1, aspartatkinază; 2, aspartat semialdehid dehidrogenază; 3, homoserin dehidrogenază; 4, homoserin kinază; 5, treonin sintetază; 6, dihidropicolinat ciclohidrolază (după Gottschalk, 1979).

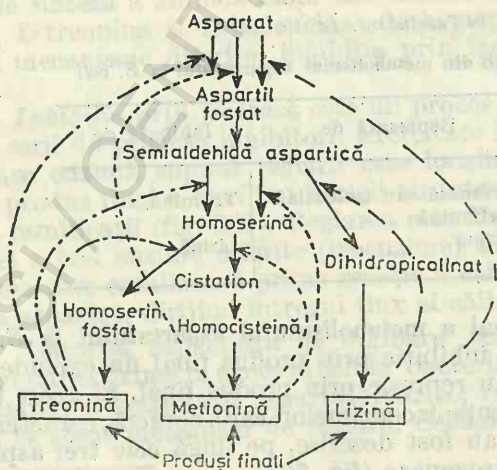


Fig. 304. — Căile de reglare a metabolismului aspartatului la *E. coli*. Săgețile continue indică reacțiile catalizate de enzime. Săgețile punctate indică inhibiția prin feedback determinată de produsul final.

serin dehidrogenaza I sint supuse unei represii bivalente de către treonin și izoleucină, fapt explicabil deoarece treonina este precursorul izoleucinei. Represia prin produs final numai prin L-treonină ar perturba metabolis-

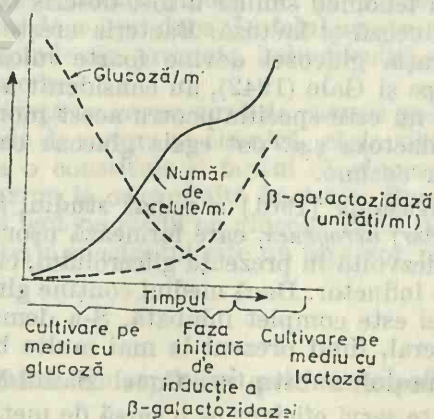
mul celular. Sinteza aspartatkinazei II și homoserin dehidrogenazei II sînt controlate de L-metionină, iar cea a aspartatkinazei III de L-lizină (fig. 304).

Din analiza figurii rezultă următoarele concluzii: 1) fiecare primă reacție din fiecare ramificație a căilor biosintetice este reglată specific de produsul final al ramificației respective; 2) există trei aspartatkinaze, fiecare reglată separat de trei produși finali de metabolism (lizina, treonina și metionina); 3) cele două homoserin dehidrogenaze sînt controlate separat și specific de doi produși finali: metionina și treonina; 4) totalitatea activităților aspartatkinazice este inhibată numai cînd toți produșii finali sînt în exces. După Gottschalk (1979), aceste căi de reglare nu pot fi extrapolate ca atare la toate bacteriile. Datele existente pînă în prezent arată că alte bacterii utilizează modalități alternative de reglare a căilor metabolice ramificate, ceea ce demonstrează că deși căile anabolice au rămas neschimbate în cursul evoluției la diferite microorganisme, modul în care pot fi controlate s-a modificat în foarte mare măsură (Gottschalk, 1979).

Represia prin catabolit

Studiul multiplicării bacteriilor în medii care conțin amestecuri de glucide a scos în evidență posibilitatea a două modalități de evoluție. În unele amestecuri de glucide, curba de creștere are o evoluție normală, prezentînd o limită maximă, cu o valoare intermediară celei a curbelor corespunzătoare fiecăruia din constituenții mediului. În alte amestecuri

Fig. 305. — Fenomenul de diauxie la *E. coli* cultivată pe un mediu cu glucoză și lactoză ca surse de C. Represia prin catabolit a formării β -galactozidazei sub acțiunea glucozei este reflectată de curba de creștere a celulelor. Perioada de lag de creștere, care urmează epuizării glucozei, reprezintă timpul necesar pentru sinteza β -galactozidazei.



însă, creșterea se exprimă sub formă aberantă, diauxică, descompunîndu-se practic în două curbe, fiecare avînd toate fazele unei curbe de creștere normale (fig. 305).

Fenomenul de diauxie a fost descris de Monod (1941), care a arătat că *Bacillus subtilis* cultivat pe un mediu cu glucoză și arabinoză, ca surse de C și de energie, utilizează inițial glucoza și după epuizarea acesteia

degradează arabinoza, rezultatul este apariția unei curbe bifazice de creștere, formată din două faze de creștere exponențială separate de o perioadă de lag intermediară, de ~ patru ore, corespunzând timpului necesar pentru sinteza enzimelor active în utilizarea arabinozei. Fenomenul a fost numită și „efectul glucozei” deoarece aceasta a fost prima substanță identificată care îl poate iniția. El a fost observat ori de câte ori *E. coli* a fost cultivată în medii care conțin un amestec de glucoză și un zahăr utilizabil cu ajutorul enzimelor inductibile (glucoză-galactoză, glucoză-xiloză etc.). Diauxia nu se produce atunci când mediul conține un amestec de glucoză cu fructoză sau manoză, glucide metabolizate de enzime „constitutive”.

Pentru a demonstra natura acestui proces, Monod (1958) a analizat fenomenul de diauxie la *B. subtilis* și la *E. coli*, folosind zaharoza, ca glucid constant, căreia i-a adăugat un glucid variabil, aparținând grupurilor A (glucoză, fructoză, manoză, manitol) sau B (sorbitol, inozitol, arabinoză, maltoză, dextrine). A observat că prima fază de creștere a celor două bacterii corespunde totdeauna utilizării totale a unui glucid din grupul A. Glucidele din grupul B nu sînt folosite niciodată, nici măcar parțial în primul ciclu. Lucrurile se petrec ca și cum cele două bacterii ar fi incapabile să utilizeze simultan cei doi constituenți ai unui cuplu de glucide. După Monod, această comportare se datorează faptului că cele două bacterii au în mod normal, în echipamentul lor enzimatic, enzimele care metabolizează glucidele din grupul A. Enzimele necesare pentru utilizarea glucidelor din grupul B nu apar decît după o perioadă de „adaptare” prealabilă, suficient de lentă pentru a explica apariția celor două cicluri succesive de creștere — separate de o perioadă de lag — ale diauxiei. În plus, după Monod, prezența în mediu a glucidelor din grupul A împiedică „adaptarea” față de cele din grupul B.

Un fenomen similar a fost descris la *E. coli* cultivată pe medii care conțin glucoză și lactoză. Bacteria crește inițial pe seama glucozei. Cînd concentrația glucozei devine foarte mică, începe să folosească lactoza. Deși Epps și Gale (1942), au considerat acest fenomen ca particular glucozei, el nu este specific pentru acest monoglucid. Acidul gluconic, manitolul, galactoza ș.a. pot egala glucoza ca efect inhibitor asupra sintezei anumitor enzime.

Magasanik (1961) a reluat studiul acestui fenomen la *Enterobacter (Aerobacter) aerogenes*, care formează ușor o enzimă inductibilă, histidaza, cînd se dezvoltă în prezența glicerolului, ca sursă de C și energie, și a histidinei, ca inductor. Dacă mediul conține glucoză în loc de glicerol, formarea histidazei este complet inhibată. S-a demonstrat astfel că fenomenul este mai general, fiind prezent la mai multe bacterii pentru o mare varietate de enzime și de substraturi. Concluzia lui Magasanik a fost că orice compus care poate servi eficient ca o sursă de metaboliți intermediari și de energie poate reduce viteza de formare a enzimelor „sensibile la glucoză”, în raport cu viteza de formare a altor proteine. El a denumit acest fenomen *represe prin catabolit*, un nume nou pentru un fenomen vechi (Ullman și Cossart, 1975). Gradul de inhibiție observat variază în funcție de tulpină, de sursa de cataboliți și de condițiile de creștere, de la cîteva procente la 90%.

Conceptul de represie prin catabolit

Magasanik (1961) a încercat să delimiteze conceptual fenomenul de represie catabolică, bazându-se pe principiul economiei („optimality”) și pe cunoștințele existente în perioada respectivă. Împreună cu Nejdhardt (1956), el a demonstrat că pentru aceeași creștere în masa celulară bacteriană se consumă de două ori mai multă glucoză (raportat la conținutul în C) decât glicerol. Aceasta demonstrează că glucoza este mai rapid metabolizată decât alți compuși ai C. Degradarea rapidă a glucozei duce la acumularea de piruvat, alți metaboliți, ATP și alți compuși macroergici. În felul acesta, metaboliții se acumulează în celula normală cu o rată mai mare decât capacitatea celulei de a-i converti în precursori imediați ai proteinelor, acizilor nucleici sau altor constituenți celulari. Ca urmare, o celulă bacteriană cultivată pe glucoză și glicocol nu va avea nici un avantaj din sinteza enzimelor necesare pentru degradarea glicerolului. Ceva mai mult, sinteza lor ar mări și mai mult acumularea de metaboliți, ar încărca inutil „mașinăria” de sinteză a proteinelor și ar risipi sursa exogenă de glicerol, care ar putea deveni utilă celulei după epuizarea glucozei. Represia catabolică intervine deci când un compus este metabolizat atât de rapid, încât nivelul metaboliților acumulați este superior cererii pentru reacțiile de biosinteză. În această situație, catabolitul ar funcționa ca un represor, furnizând informația că există o rezervă suficientă de produși intermediari. După Magasanik (1961), activitatea catabolică ar duce în ultimă instanță la formarea unui număr restrâns de produși (cataboliți), care funcționează atât ca substraturi pentru enzimele de biosinteză, cit și ca represori capabili să controleze diferitele căi pentru formarea enzimelor catabolice. În această calitate, ei vor repressa nu numai enzimele căii metabolice prin care au fost efectiv produși, ci și enzimele oricărei alte căi, care are potențialitatea de a-i produce. În felul acesta, rata sintezei unei enzime catabolice depinde de prezența inductorului ei specific, ca și de nivelul cataboliților produși.

După Stanier (1970), eficiența cu care o sursă de energie poate acționa în represia catabolică nu depinde de natura sa chimică, ci de viteza cu care poate fi metabolizată. Dovada o constituie și faptul că glucoza este eficientă în represie la *E. coli*, dar nu la oricare altă bacterie. Spre exemplu, *Pseudomonas putida* crește mai lent pe medii cu glucoză decât pe succinat. Ca urmare, pentru această bacterie succinatul este un represor mai eficient decât glucoza.

Mecanismul molecular al represiei prin catabolit

Cercetări ulterioare (Zubay, 1973) au demonstrat că represia prin catabolit este un fenomen corelat și controlat de concentrația AMPc în celulă. Nevoia de AMPc pentru sinteza β -galactozidazei și a celorlalte enzime ale operonului *lac* a fost evidențiată prin experiențe care au demonstrat imposibilitatea formării lor în sisteme acelulare pentru biosinteza proteinelor, în absența acestui compus. Ca și în alte situații similare, AMPc nu stimulează direct sinteza de ARNm, ci numai prin legarea sa prealabilă de proteina CAP, care, la rîndul său, este inactivă, nelegată de AMPc.

În cursul utilizării glucozei de către *E. coli* se produce o scădere masivă a concentrației intracelulare de AMPc și, ca urmare, transcrierea operonului *lac* este efectiv suprimată. Când concentrația glucozei în mediu scade, AMPc se acumulează în celulă și odată cu aceasta capacitatea bacteriei de a transcrie operonul *lac* crește, datorită prezenței complexului de inițiere AMPc—CAP. El se fixează pe un situs special în structura promotorului, măbind de ~20 de ori afinitatea acestuia pentru ARN polimerază. Prin acest mecanism, bacteria „recunoaște” în fapt epuizarea glucozei din mediu și mărește frecvența de inițiere a sintezei ARNm, pentru utilizarea celui de-al doilea glucid din mediu, lactoza. Această comportare explică mecanismul molecular al fenomenului de diauxie.

Importanța practică a represiei prin catabolit. Acest fenomen este deosebit de semnificativ deoarece multe enzime cu importanță actuală sau de perspectivă pentru industrie sînt supuse acestui tip de reglare. Evitînd prezența în mediu a unor surse de C represoare, producția enzimelor poate fi stimulată semnificativ (tabelul nr. 45).

Tabelul nr. 45

Represia prin catabolit a unor enzime (după Demain, 1972)

Enzima	Microorganismul	Sursa de carbon represoare	Autorii
α -amilaza	<i>B. stearothermophilus</i>	Fructoza	Welker și Campbell (1963)
Celulaza	<i>Trichoderma viride</i>	Glucoza, glicerolul, amidonul, celobioza	Mandels și Weber (1963)
Celulaza	<i>Pseudomonas fluorescens</i> var. <i>cellulosa</i>	Galactoză, glucoza, celobioza	Yamane și Suzuki (1970)
Proteaza	<i>Bacillus megaterium</i>	Glucoza	Din și Chaloupka (1969)
Proteaza	<i>Candida lipolytica</i>	Glucoza	Meyers și colab. (1970)
Transeliminaza acidului poligalacturonic	<i>Aeromonas liquefaciens</i>	Glucoza, acidul poligalacturonic	Hsu și Vaughan (1962)
Amiloglicozidaza	<i>Endomyces bispora</i>	Amidonul, maltoza, glucoza, glicerolul	Zwickler (1968)

Astfel, utilizarea glicerolului în locul fructozei poate crește de peste 25 de ori producția de α -amilază extracelulară de către *Bacillus stearothermophilus* (Welker și Campbell, 1963). În mod similar, *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*, cultivată pe medii cu glicerol, produce de 1 500 ori mai multă celulază decât în cazul cultivării pe medii cu galactoză (Yamane și Suzuki, 1970). Creșterea randamentului de biosinteză a enzimelor în aceste cazuri poate fi realizată și prin folosirea unui inductor analog, utilizabil lent, ca și cu ajutorul tulpinilor mutante rezistente la represia prin catabolit. Astfel, Lampen (1967) a obținut levuri rezistente la represia prin catabolit, care produc invertază în concentrații care reprezintă ~2 % din proteina celulară totală.

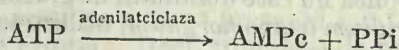
Rolul AMPe și al proteinei CAP

Studiul mecanismului molecular al reglării activităților celulare și al biosintezei proteinelor a scos în evidență rolul esențial al unor proteine auxiliare și corelat cu acesta importanța unei molecule cu funcții mai complexe, AMP ciclic. S-a demonstrat că alături de prezența unui inductor specific, AMPe și proteina receptoare a AMPe (CAP), asigură sinteza multor enzime inductibile la *E. coli*. Spre deosebire de inductori, care stimulează numai sinteza proteinelor necesare pentru metabolismul lor, AMPe controlează și sinteza altor tipuri de proteine.

Proteina receptoare a AMPe. CAP („cAMP receptor protein”) numită și proteina CAP („catabolite activation protein”) sau CGA („catabolite gene activation protein”) este un dimer (g.m. ~50 Kdal), produs al genei *crp*. În cazul operonului *lac* de la *E. coli*, ea se leagă de o secvență nucleotidică specială, în regiunea promotor, situată cu ~60 nucleotide înainte de punctul de origine a transcrierii.

După legare, ea poate efectua „deschiderea” promotorului, fie prin interacțiune cu ARN polimeraza, fie afectând direct ADN. Legarea proteinei CAP de ADN nu este un eveniment independent, deoarece este condiționată de prezența AMPe. Ea are o afinitate deosebită față de acesta, care atunci când este independent este inactiv. Complexul CAP—AMPe se leagă de ARN polimerază pentru a produce un complex ternar, care permite inițierea sintezei de ARNm.

Adenozin-3', 5' monofosfatul ciclic (AMPe), izolat de Sutherland Jr. (1958), este considerat ca un metabolit-cheie necesar pentru transcrierea genetică a tuturor operonilor sensibili la catabolismul glucozei (fig. 306). Nivelul AMPe în celule este determinat de activitatea adenilat ciclazei (AMPe sintetaza), enzimă legată de membrana celulară, care catalizează reacția :



Ea este foarte activă când componenții sistemului de transport prin membrane (sistemul fosfotransferazelor) sînt fosforilați, așa cum se întâmplă cînd glucidele transportabile lipsesc din mediu. În aceste condiții, nivelul intracelular al AMPe crește. În prezența glucidelor, gradul de fosforilare a sistemului de transport scade, din cauza fosforilării moleculelor care trec prin membrane. Adenilatciclaza devine mai puțin activă și nivelul

AMPe în celulă scade. Concentrația AMPe în celule poate fi influențată și de un grup de enzime, nucleotid fosfodiesterazele ciclice, care pot hidroliza AMPe la 5'-AMP. Deoarece aceste enzime sînt prezente constant în citoplasmă, AMPe intracelular are o durată de viață scurtă.

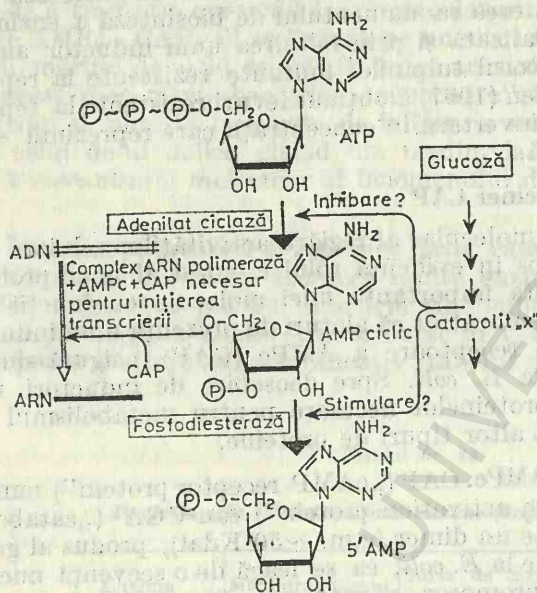


Fig. 306. — Controlul transcrierii genetice sensibile la catabolit prin AMPe (după Watson, 1977).

Studiul mecanismului molecular al represiei prin catabolit la *E. coli* a arătat existența unei relații inverse între cantitatea de glucoză din celulă și cantitatea de AMPe, lăsînd impresia că gluciza sau un catabolit al său acționează inhibînd adenilatciclaza. Studiile ulterioare (Pastan și Perlman, 1970; Pastan, 1972; Rickenberg, 1974) au demonstrat că nu gluciza *per se* reprezintă factorul determinant al represiei prin cataboliți, ci modificarea concentrației unui metabolit AMPe, în cursul utilizării mai multor surse de C și energie. Acest punct de vedere a fost confirmat de trei observații importante:

- 1) La *E. coli*, represia prin catabolit se manifestă pentru diferite combinații de substraturi, în așa fel încît gluciza reprezintă inducția mai multor căi metabolice, ca, de exemplu, cele ale lactozei, arabinozei, sorbitolului, xilitolului și glicerolului.
- 2) Represia catabolică nu este dominată de gluciza la toate bacteriile. Spre exemplu, la *Clostridium tetanomorphum*, utilizarea glucizei este repressată de prezența L-glutamatului.
- 3) Pentru anumiți operoni, fenomenul are un caracter de generalitate, în sensul că „înfometarea” bacteriei cu C este însoțită de acumularea de AMPe, în timp ce în prezența sursei specifice de C (gluciză, glicocol etc.), în concentrații suficiente pentru creștere, cantitatea de AMPe va fi insuficientă pentru a forma complexul CAP-AMPe-ARN polimerază, necesar pentru inițierea transcrierii unor operoni. Pe baza acestor cerce-

ări s-a demonstrat că substraturile utilizate rapid de sistemele enzimă-tice constitutive produc — ca regulă generală — represia catabolică a căilor inductibile.

Semnificația generală a AMPe. Până în prezent, AMPe a fost eviden-țiat la un număr restrins de bacterii ca : *E. coli*, *Anacystis*, *Brevibacterium*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Cau-lobacter* etc. (Rickenberg, 1974), dar răspindirea sa la procariote pare universală. Această concluzie se bazează pe poziția sistematică diferită a bacteriilor menționate și pe faptul că la o serie de bacterii un număr mare de activități sint afectate fie de AMPe exogen, fie de procesele care modifică nivelul endogen al AMPe. După Weinberg (1970), el ar juca un rol impor-tant în diferite activități celulare ca, sinteza metabolitilor secundari, asigurarea competenței în transformarea genetică și chiar în unele procese morfogenetice ca formarea flagelilor (tabelul nr. 46).

Tabelul nr. 46

Efectele AMP ciclic (după Rickenberg, 1974)

Fenomenul afectat	Organismul	Fenomenul afectat	Organismul
Reglarea sintezei proteinelor	Probabil toate bacteriile	Competența în trans-formarea genetică	<i>Haemophilus influenzae</i>
Chemotaxia	<i>E. coli</i>	Biosinteza prodigio-zinei	<i>Serratia marcescens</i>
Creșterea anaerobă	<i>E. coli</i>	Producerea de ente-rotoxină	<i>Vibrio cholerae</i>
Fosforilarea oxi-dativă	<i>E. coli</i>	Biosinteza antigene-lor somatice și a unor constituenți ai pere-telui celular	<i>V. cholerae</i>
Activitatea decar-boxilazei malice	<i>E. coli</i>	Diferențierea	<i>Caulobacter crescentus</i>

Toate aceste efecte sau, probabil, cele mai multe ar fi mediate de rolul AMPe în stimularea sintezei proteinelor. În general, se consideră că la procariote, AMPe își exercită efectul în special prin stimularea sin-tezei unui număr de proteine a căror prezență sau funcție nu este esențială în toate condițiile de creștere. Deci, rolul său de reglare este foarte sigur, dar nu esențial. Dovada o constituie faptul că la *E. coli* mutantele cu deleții în gena *cya* (adenilataciclaza) nu pierd funcții esențiale. După Rickenberg (1974), caracterul ubicvitar al AMPe sugerează antichitatea sa evolutivă.

Activitatea AMPe în celulele eucariote, inclusiv la organisme multice-lulare prezintă unele asemănări și deosebiri față de procariote. Unele din datele obținute pe modele experimentale bacteriene sint în mare măsură extrapolabile, probabil, și la eucariote. În ambele tipuri de celule,

AMPc mobilizează rezervele potențiale de C și energie, cînd sursele din mediu devin limitante. La bacterii, concentrația celulară a AMPc este reglată de nevoile energetice ale celulei: nivelul AMPc este scăzut cînd producția de energie depășește nevoile celulei pentru biosinteze. Invers, nivelul AMPc crește cînd bacteria este lipsită de o sursă de C și de energie. În celulele bacteriene, AMPc are efect în special asupra sintezei proteinelor, în timp ce la multicelulare afectează atît biosinteza, cît și activitatea proteinelor. După Rickenberg (1974), efectul ar fi în acord cu viața scurtă a unei bacterii individuale într-o cultură, în opoziție cu longevitatea relativă a majorității celulelor din organisme pluricelulare. Datorită capacității sale de a reorienta metabolismul bacterian pentru a atenua deficitul celular în sursa de C și energie, prin utilizarea unei surse alternative din mediu, AMPc ar face parte din categoria substanțelor descrise de Ames, Stephens și Artz (1975) sub denumirea de *alarmoni* *.

Modelul general de acțiune a complexului CAP—AMPc

Cercetările lui Pastan și Perlman (1970, 1972) au permis elaborarea unui model general de acțiune a complexului CAP—AMPc (fig. 307), bazat pe intervenția tuturor elementelor de reglare în activitatea opero-

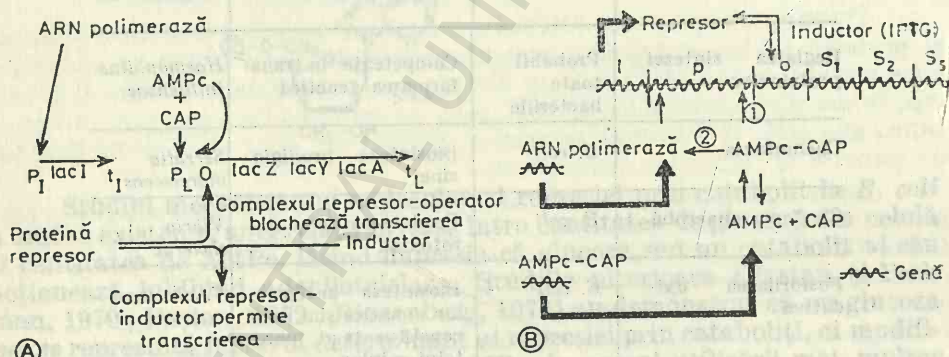


Fig. 307. — A. Reglarea operonului *lac*. Săgețile orizontale reprezintă ARNm corespunzător cistronilor notați sub ele. *P* — promotor; *t* — terminus; *O* — situsul de legare a represorului. AMPc și CAP sînt necesare pentru legarea ARNpol de *P_L*, nu însă și de *P₁* (după Birge, 1981). B. Schema acțiunii AMPc asupra operonului *lac*. Săgețile groase indică producții genelor, iar cele subțiri, reacțiile pe care le produc (după Pastan și Perlman, 1970).

nului *lac* ale cărui detalii de structură și funcție sînt cel mai bine cunoscute. În absența lactozei din mediu, transcrierea operonului *lac* este blocată de represorul *lac* (produs al cistronului *c I*), care este legat de operator, împiedicînd legarea ARN polimerazei, fie prin crearea unui obstacol fizic, fie împiedicînd „deschiderea” moleculei de ADN dublu helical.

Promotorul *lac* (*P_L*) are în structura sa două regiuni: 1) regiunea de interacțiune și legare inițială a ARN polimerazei și 2) regiunea de legare

* *Alarmonii* sînt, după Ames și colab. (1975), molecule cu rol de supersemnal, elaborate de celulele bacteriene ca răspuns la un stress. Ele intervin în procesele de reglare, permițînd restabilirea echilibrului metabolic al celulei.

a proteinei CAP, la nivelul căreia se fixează complexul AMPc—CAP, situată mai departe de operator (fig. 308).

În prezența inductorului, represorul este desprins de operator, însă legarea ARN polimerazei este condiționată de legarea la situsul specific a complexului AMPc—CAP. Numai în aceste condiții, are loc formarea

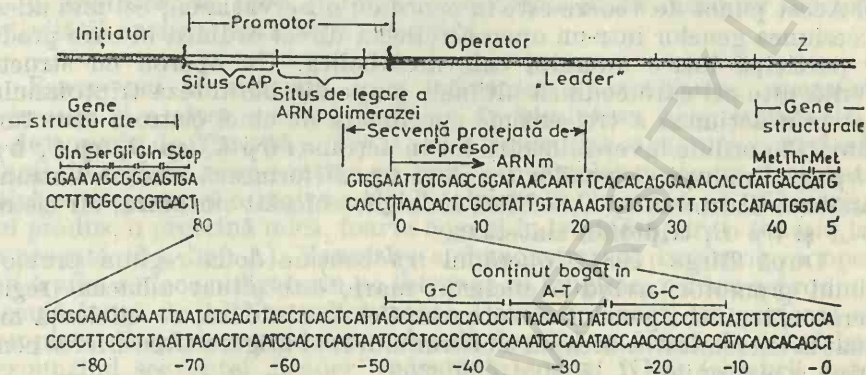


Fig. 308. — Secvența nucleotidelor în regiunea promotor la *E. coli*, indicind relația sa cu secvențele operator suprapuse (după Watson, 1977).

ARNm *lac* policistronic. Când lactoza din mediu este epuizată sau dacă se adaugă glucoză, legarea ARN polimerazei este din nou împiedicată și viteza de sinteză a ARNm *lac* revine la nivelul scăzut original.

Din analiza acestui model general rezultă câteva particularități importante ale reglării mediate de AMPc, valabile pentru toți operonii care funcționează în mod analog operonului *lac*: 1) cit timp proteina represor este legată de promotor, efectul complexului AMPc—CAP este nul; 2) inițierea transcrierii genetice necesită și prezența unui inductor specific, necesar pentru îndepărtarea represorului.

Ca urmare, reglarea operonului se exercită la două nivele: 1) un control negativ, exercitat prin represie și 2) un control general pozitiv exercitat de complexul AMPc—CAP *. Prin acest joc de blocare și stimulare a transcrierii genetice, *E. coli* dobîndește flexibilitatea necesară pentru utilizarea eficientă a nutrienților din mediu. Bacteriile nu stochează cantități mari de glucide, ci se dezvoltă cu maximum de economie pe seama substanțelor prezente în imediata lor vecinătate. Dovada o constituie faptul că atunci cînd *E. coli* găsește în mediu glucoză și lactoză o folosește pe prima, fără a cheltui energie pentru a produce enzimele catabolismului lactozei (Pastan, 1972; Rickenberg, 1974). Faptul că AMPc stimulează transcrierea mai multor operoni diferiți, în timp ce represorul este specific, conferă un plus de flexibilitate în utilizarea diferiților nutrienți.

* Deși operonul *lac* include elemente de reglare pozitivă și negativă, ca toți operonii cu structură și funcții similare, este considerat sub control negativ, deoarece codifică formarea unei proteine-represor (Birge, 1981).

Alte tipuri de organizare a operonilor bacterieni

Operonul triptofan

Fenomenul de „atenuare”

Organizarea operonului *lac* este considerată frecvent ca furnizînd un model general de structură și funcție a unităților de reglare de acest tip. Acest punct de vedere este în acord cu observația că, cel mai adesea, succesiunea genelor într-un operon reflectă direct ordinea în care produșii lor participă într-o anumită cale metabolică. Un operon cu structură diferită este cel care codifică ultimele etape din biosinteza triptofanului* (*trp*) prin acțiunea a trei enzime specificate de cinci cistroni structurali, aranjați în ordine inversă intrării lor în acțiune: *trp E*, *trp D*, *trp C*, *trp B* și *trp A*. Produșii cistronilor *trp E* și *trp D* formează enzima antranilat sintetaza. Cistronul *trp C* codifică indolglicerofosfat sintetaza, iar cistronii *trp A* și *trp B*, triptofan sintetaza.

După Birge (1981), operonul *trp* conține două regiuni promotor. Primul promotor, avînd o eficiență mare, este situat adiacent regiunii operator, înaintea genelor structurale. Cel de al doilea, cu eficiență mică, situat la extremitatea dreaptă a cistronului D asigură transcrierea constitutivă a cistronilor *C*, *B* și *A* (fig. 309).

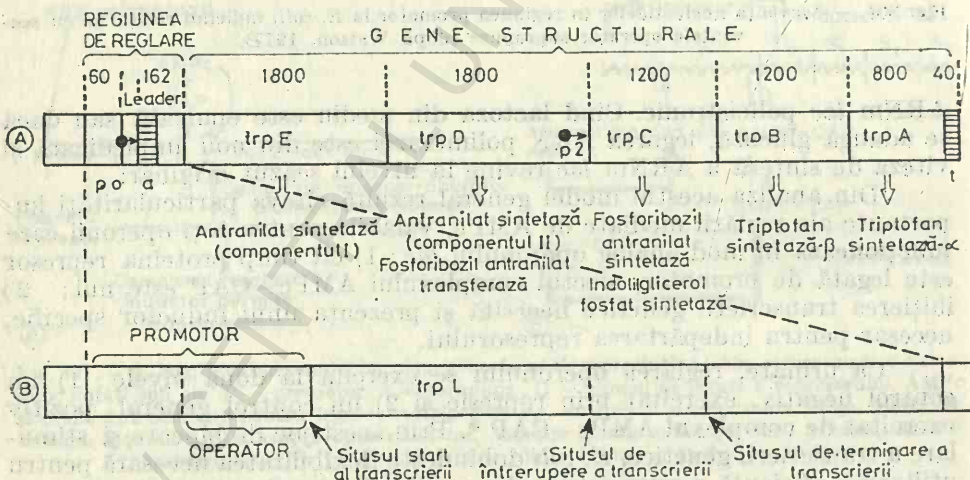


Fig. 309. — Reglarea exprimării genelor din operonul triptofan al *E. coli*. A. Reprezentarea schematică a operonului, cu menționarea numărului nucleotidelor/cistron. p 1, p 2 = promotor 1 și 2; o — operator; a — atenuator; t — terminus; B. Detaliu de structură a regiunii de reglare.

Transcrierea operonului *trp* este controlată de o proteină-represor, produs al genei *trp R*, situată în poziția 100 min pe harta genetică a *E. coli*, în timp ce operonul reglat de ea este situat în poziția 27 min.

* Un tip de organizare foarte diferit de operonul *lac* este cel al operonului histidină a cărui structură nu prezintă nici o relație aparentă între secvența cistronilor *his* (*his E*, *his I*, *his F*, *his A*, *his H*, *his B*, *his C*, *his D*, *his G*, operator) și ordinea în care acționează produșii lor (fig. 315). Se adaugă în calea de sinteză a histidinei, participarea altor șase cistroni (*his S*, *his T*, *his P*, *his W*, *his R* și *his U*) situați în regiuni diferite ale cromosomului.

După date unanim acceptate, operonul *trp* este supus la două mecanisme obișnuite de reglare :

1) *Represia sintezei enzimelor* este determinată de legarea represorului *trp R* de regiunea operator, după complexarea sa cu triptofanul însuși sau cu un analog al acestuia. Acest proces reduce de 70 de ori concentrația enzimelor prezente ;

2) *Inhibarea de către triptofan* (acționând ca un inhibitor alosteric) a activității enzimei antranilat sintetaza.

Fenomenul de atenuare, care influențează exprimarea operonului *trp* precum și a altor operoni implicați în biosinteza unor aminoacizi, a fost descoperit de Yanofsky (1981). El a evidențiat structura complexă a regiunii de reglare, care conține pe lângă secvențele promotor și operator, parțial suprapuse, și o regiune *trp L* („leader”), lungă de ~ 162 baze, al cărui produs, o proteină mică, foarte bogată în triptofan, are o funcție încă necunoscută (fig. 309 A). Yanofsky a demonstrat că transcrierea operonului *trp* nu se face obligatoriu pe întreaga sa lungime, pentru a produce o moleculă lungă de ARNm policistronic. Foarte frecvent, transcrierea este incompletă. După ce a produs o moleculă de ARNm, lungă de ~ 140 baze, corespunzând secvenței „leader” bogată în codoni UUG (singurii codoni care specifică legarea triptofanului în sinteza proteinelor), sinteza ARNm este blocată. Stoparea prematură a transcrierii are loc la nivelul unui situs atenuator *trpEa* care împiedică transcrierea genelor structurale *trp*. Chiar *in vitro*, într-un sistem acelular transcrierea operonului *trp* izolat și purificat are ca rezultat producerea a două tipuri diferite de ARNm : unul lung, care poartă informația cistronilor structurali, și altul mic, corespunzător primelor 140 de baze din secvența „leader”.

Mecanismul molecular al atenuării. Yanofsky a demonstrat că apariția procesului de atenuare (blocarea transcrierii integrale a operonului *trp* la ARNm policistronic funcțional) și, prin aceasta, diminuarea sintezei enzimelor care determină biosinteza triptofanului la *E. coli* sînt condiționate de modul în care este pliată molecula de ARNm, pe cale de formare, respectiv de structura sa secundară. La rîndul său, această structură este determinată de gradul în care ribosomii au tradus începutul mesajului genetic.

În prezența unei concentrații convenabile de triptofan în mediu, prima secțiune a ADN *trp* este transcrisă și tradusă normal, cu formarea proteinei *L* („leader”). În acest caz, segmentul următor al ARNm *trp* formează o structură secundară particulară („stem and loop”), care produce terminarea prematură a transcrierii operonului, deoarece nu mai permite ARN polimerazei să transcrie genele structurale ale operonului (fig. 310).

Cînd concentrația triptofanului în mediu scade sub anumite limite, procesul de atenuare este anulat. ARNm formează un alt tip de structură secundară, care permite ARN polimerazei să continue transcrierea întregului operon.

Din aceste date rezultă că starea de atenuare corespunde situației normale a bacteriilor. Ea este caracterizată prin faptul că ARNm cu di-

mensiuni mici, corespunzând secvenței „leader”, rezultat din stoparea prematură a transcrierii, reprezintă 80—90 % din totalul ARNm transcris.

Procesul de atenuare a fost descris și la alte tipuri de operoni, la mai multe bacterii. Aceasta sugerează posibilitatea răspîndirii sale largi sau chiar universale la celulele procariote. Semnificația sa deosebită este suge-

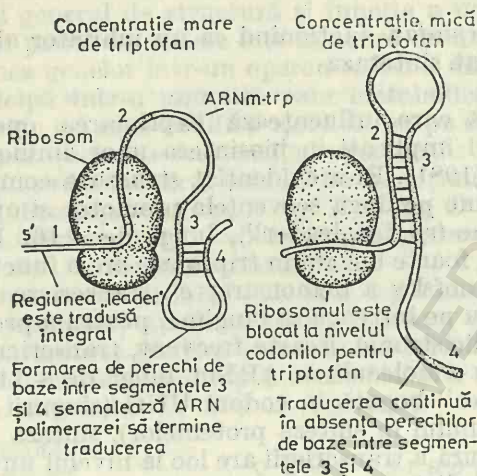


Fig. 310. — Reprezentarea schematică a mecanismului molecular al fenomenului de atenuare în operonul triptofan (după Watson și colab., 1983).

rată de observațiile făcute pe *E. coli*, la care absența triptofanului din mediu mărește exprimarea operonului *trp* pe două căi: 1) prin îndepărtarea represorului activat în mod normal de triptofanul care mărește transcrierea de ~70 de ori și 2) prin suprimarea stării de atenuare, care crește rata transcrierii de încă 8—10 ori. Aceasta corespunde unei creșteri medii a exprimării operonului *trp* de ~600 de ori. Această particularitate, precum și prezența fenomenului la multe din bacteriile studiate sugerează că asocierea represiei cu atenuarea oferă celulei bacteriene un spectru mai larg și mai economic de modalități de reglare decât ar fi posibil numai cu unul din sisteme.

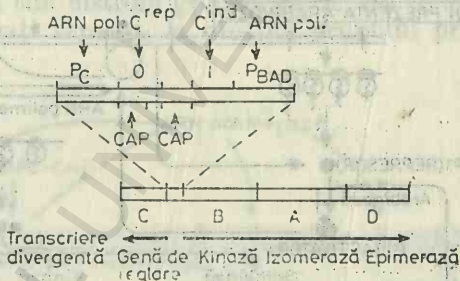
Operonul arabinoză. Inducția controlată de activator

Structura și reglarea operonului arabinoză a fost stabilită relativ recent, prin cercetările lui Hirsh și Schleif (1976), precum și ale lui Ogden și colab., (1980). El este alcătuit din 5 gene structurale și o genă de reglare.

Principalele gene ale operonului, *ara B*, *ara A* și *ara D*, sînt grupate în această ordine și codifică enzimele L-ribuloz-5-P-4-epimeraza, L-arabinozizomeraza și respectiv L-ribuloz-5-P-4-epimeraza, care asigură conversia L-arabinozei la D-xiluloz-5-fosfat. Gena *ara E* codifică o permează cu afinitate slabă, iar *ara F* o proteină de legare cu afinitate ridicată. Aceste două gene nu sînt legate de partea principală a operonului, dar sînt supuse aceluiași sistem de control.

Gena *ara C* este separată fizic de genele *ara B, A, D* la o distanță de ~ 150 pb, prin interpunerea unei secvențe nucleotidice, cunoscută sub denumirea de regiunea centrală de control. Exprimarea genei *ara C* este controlată separat de genele *ara B, A, D*. Ea are o orientare în sens opus și este transcrisă de la extremitatea dreaptă adiacentă regiunii centrale de reglare spre stânga (Wilcox și colab., 1974). Produsul său este un compus liber difuzibil, care controlează sinteza celor trei enzime și a celor două sisteme de transport. Transcrierea genelor *ara B, A, D* are loc în sens opus, de la stânga spre dreapta (transcriere divergentă). Datorită acestei structuri particulare, regiunea centrală de reglare conține două situsuri promotor separate, pentru genele *ara C* și *ara B, A, D*, situsul operator (O) și situsul inițiator (I), ca și două situsuri de legare pentru complexul AMPc—CAP (fig. 311).

Fig. 311. — Schema operonului arabinoză. Transcrierea este divergentă față de regiunea centrală de reglare. În cursul repressiei, produsul genei *ara C* se leagă, în conformația sa de represor (C^{rep}), de situsul operator, împiedicând transcrierea spre dreapta și blocând cele două situsuri de legare cAMP/CAP. După inducție, C^{rep} trece în conformația activă, C^{ind} , se leagă de situsul I și cu complexul adiacent cAMP/CAP stimulează transcrierea cistronilor *ara B, A, D*. Situsul cAMP/CAP sting stimulează transcrierea cistronului *ara C* (după Priest, 1983).



Reglarea operonului arabinoză. Englesberg (1965, 1969) a sugerat că proteina de reglare produsă de gena *ara C* ar putea acționa atât ca represor, cât și ca activator, prin legarea sa de situsuri diferite ale regiunii de reglare. Savageau (1975), precum și Hirsh și Schleif (1976) au confirmat acest punct de vedere, stabilind unele detalii privind mecanismul molecular al acestui proces.

În absența arabinozei din mediu, gena *ara C* codifică biosinteza unei proteine represor, C^{rep} (sau P1), care se leagă de situsul operator (O), situat adiacent genei *ara C*, blocând situsurile de legare ale complexului AMPc—CAP și împiedicând transcrierea cistronilor operonului.

În prezența arabinozei în mediu, proteina represor C^{rep} suferă o tranziție spre conformația de activator C^{ind} (P2). În această formă, C^{ind} se leagă de situsul inițiator I, situat în vecinătatea promotorului BAD, și împreună cu complexul AMP—CAP adiacent stimulează transcrierea genelor *ara B, A, D*. Situsul sting AMP—CAP stimulează transcrierea spre stânga a genei *ara C* (Hirsh și Schleif, 1976; Priest, 1983).

Mecanismul tranziției $C^{rep} \rightarrow C^{ind}$ nu este cunoscut. Probabil că proteina *Ara C* ar suferi o modificare conformațională, prin legarea sa de arabinoză, care ar permite situsului inițiator să lege eficient ARN poli-

meraza și să asigure transcrierea (fig. 312). Aceste date demonstrează că proteina de reglare *Ara C* a operonului arabinoză acționează atât ca represor, cât și ca activator. Ea îndeplinește acest rol legându-se de situsuri diferite pentru represor (situsul O) și pentru activator (situsul I). Funcția sa predominantă este aceea de activator.

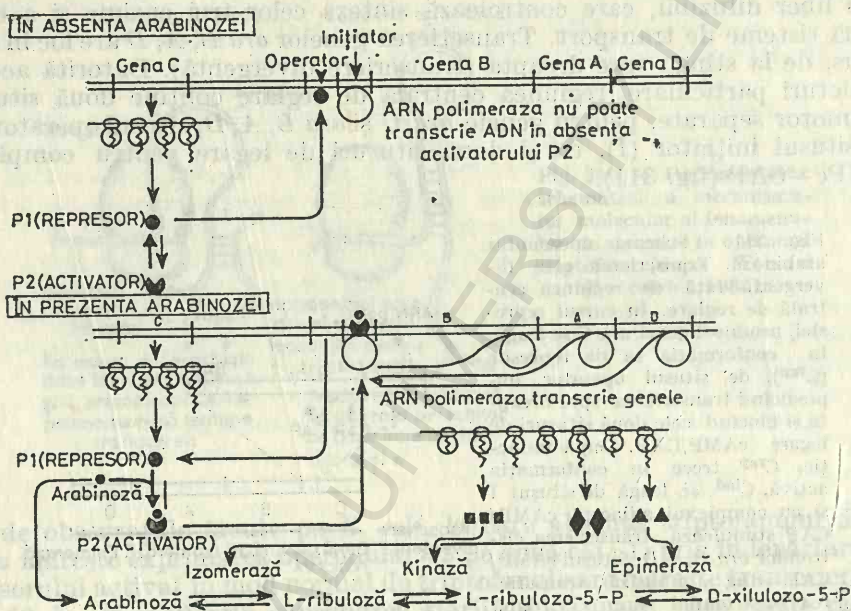


Fig. 312. — Reprezentarea schematică a represiei și inducției operonului arabinoză. În absența inductorului, represorul P1, produs al genei C se leagă de operator. Situsul inițiator este lipsit de activator (P2). Ambele condiții împiedică transcrierea genelor distale B, A, D de către ARN polimerază. În prezența arabinozei, conversia represorului P1, în activator (P2) deplasează represorul de pe operator, iar prezența activatorului pe regiunea inițiator permite transcrierea genelor B, A, D, ceea ce asigură sinteza enzimelor căii metabolice respective.

Operonul arabinoză prezintă un exemplu de reglare la distanță, deoarece proteina *ara C* se leagă într-o regiune a ADN și afectează exprimarea genelor îndepărtate. Distanța dintre proteina legată de ADN și genele pe care le controlează este de ~100 pb. Această acțiune la distanță este mediată de o regiune din ADN situată între genele B și C. Clivarea ADN în această zonă suprimă efectul de reglare la distanță și gena *ara C* este exprimată simultan cu genele *ara B, A, D* (Priest, 1983).

Pentru explicarea interacțiunilor la mare distanță au fost propuse trei ipoteze:

- 1) Legarea proteinelor de ADN într-o anumită poziție poate afecta înclinația bazelor acestuia, împiedicând legarea altor proteine pe o distanță de câteva perechi de baze.

- 2) După legarea sa de unele proteine, ADN poate forma o buclă în „ac de păr”, aducând în contact două regiuni îndepărtate ale sale. În felul acesta, legarea proteinei într-un anumit punct poate afecta activitatea genelor la o distanță relativ mare.

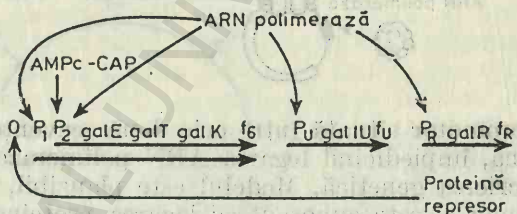
3) Efectul la distanță ar putea fi numai aparent. Proteinele s-ar putea lega inițial într-o anumită poziție, pentru ca apoi să „alunece” de-a lungul moleculei de ADN în altă poziție, la care afectează exprimarea genelor.

Operonul arabinoză oferă, de asemenea, exemplul unor modalități complexe de reglare : negativă, prin acțiunea represorului C^{rep} , și pozitivă, prin aceea a proteinei activator C^{ind} , ambii produși ai aceleiași gene *ara C*. El este supus și represiei prin catabolit.

Operonul gal. Prezența elementelor de reglare în unele gene structurale

Datele referitoare la modul de reglare a operonului *gal*, care codifică enzimele ce permit utilizarea galactozei, ca unică sursă de C și energie de către *E. coli*, sînt contradictorii. Structura sa este destul de complexă și particulară, fiind alcătuit din trei cistroni grupați *gal K*, *gal T* și *gal E* și alți doi *gal U* și *gal R*, situați separat, la dreapta grupului principal (fig. 313).

Fig. 313. — Mecanismul de reglare a operonului galactoză. Săgețile orizontale indică mărimile moleculelor de ARNm (după Birge, 1981).



Cistronul *gal K* codifică o kinază care convertește galactoza la galactozo-1-fosfat.

Cistronul *gal T* codifică o transferază, care leagă galactoza fosforilată de UDPG pentru a forma UDP gal și glucozo-1-fosfat. Final, epimeraza, produsul genei *E*, convertește UDP gal la UDPG și ciclul se repetă.

Cistronul *gal U* ar fi, după unii autori, implicat în transportul glucozei prin membrana celulară sau ar forma o pirofosforilază, care formează UDPG de la UTP și glucozo-1-fosfat, pentru a iniția ciclul.

Cistronul *gal R* ar codifica sinteza unei proteine represor, care se leagă de situsul operator.

Grupul principal al genelor structurale are două situsuri promotor : P1 (cu eficiență scăzută), necesar pentru a asigura concentrația scăzută de UDP gal utilizată pentru biosinteza membranei celulare, și P2 (care asigură un nivel ridicat de activitate enzimatică), necesar pentru utilizarea galactozei ca unică sursă de C. Cistronii izolați, *gal U* și *gal R*, au promotori proprii, Pu și respectiv Pr. Prezența unui situs operator situat în amonte față de promotor, fără nici o suprapunere cu acesta, nu putea explica modul în care simpla legare a represorului poate împiedica legarea ARN polimerazei. A fost propus un model ipotetic, de acțiune la distanță, considerat ca nesatisfăcător de specialiști, deoarece implică o modificare

conformațională a ADN, greu de explicat, prin care legarea ARN polimerazei devenea imposibilă. Recent, Irani, Orosz și Adhya, (1983), stabilind secvența nucleotidelor din operonul *gal*, au descris prezența unui element de control de tipul genei operator, situat chiar în gena structurală. El este orientat în direcție opusă celui dintâi. Inițial, s-ar realiza fixarea unei molecule de represor de fiecare situs operator. Ulterior, cele două molecule de represor s-ar lega una de alta, pentru a forma un dimer (fig. 314). Regiu-

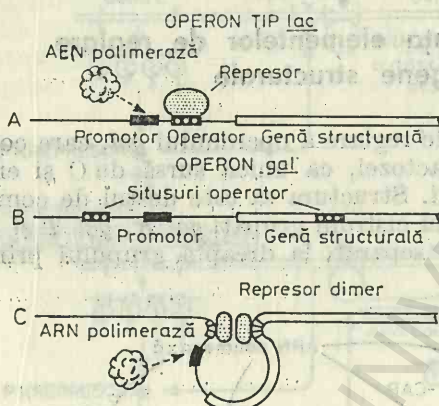


Fig. 314. — Diferențe structurale și funcționale între operonii *lac* și *gal*. În operonul *lac*, legarea unei molecule de represor, la un situs operator, blochează legarea și înaintarea ARNpol (A). În operonul *gal* (B), două molecule de represor se leagă de două situsuri operator, formind un dimer. Situsul promotor formează o buclă prin care este blocată transcrierea genetică (C) (după Kolata, 1983).

nea promotor situată între cele două secvențe operator formează o buclă externă, împiedicind legarea ARN polimerazei și, prin aceasta, represind transcrierea genetică. Modelul este plauzibil, deoarece represorul *gal* este un dimer și este cunoscut că legarea proteinelor de ADN poate modifica structura acestuia nu numai în imediata vecinătate, ci și la distanță.

După Adhya (1983) și Kolata (1983), prezența mai multor situsuri operator într-un operon ar fi un fenomen mai general, întâlnit nu numai la bacterii, ci și la levuri. Astfel, operonul *lac* ar avea, pe lângă regiunea operator descrisă în modelul clasic al lui Jacob și Monod, încă doi operatori adiționali. Primul ar fi situat înaintea primei gene structurale, iar celălalt, imediat înaintea promotorului *lac*. Represorul *lac* se leagă de ei cu o afinitate de 10—100 de ori mai mică. De aceea, aceste situsuri au fost considerate ca pseudooperatori și, în consecință, sînt mai puțin studiate.

Conceptul de reglare autogenă a exprimării genelor

Goldberger (1974) a reunit sub denumirea de reglare autogenă cazurile particulare în care molecula reglatoare nu este codificată de o genă de reglare, ca în cazul operonului *lac*, ci este produsul unei gene structurale, aparținând operonului pe care îl reglează. Ideea nu este integral nouă, deoarece Maas și McFall (1964) au sugerat că prima enzimă alosterică a unei căi metabolice poate juca un rol în reglarea exprimării operonului în care este situată gena structurală ce a codificat-o. În mod similar, Cline și Bock (1966), precum și Koshland și Kirtley (1967) au sugerat,

pe considerente teoretice, posibilitatea existenței unor mecanisme similare de reglare, implicând un control exercitat la nivelul traducerii genetice de către lanțul polipeptidic în curs de formare.

Stabilirea caracterului autogen al unui proces de reglare este destul de dificilă, deși există un acord aproape unanim referitor la existența sa în diferite sisteme virale, procariote sau chiar eucariote.

Reglarea sintezei histidinei

Goldberger (1974) citează ca un exemplu tipic modul de reglare a sintezei histidinei la *S. typhimurium*. Când histidina este absentă din mediu, această bacterie o sintetizează de la 5-fosforibozil-1-pirofosfat, ATP și glutamină. Operonul *his* are o structură complexă (fig. 315), incluzând cel puțin nouă gene structurale cu funcție identificată și cinci gene de reglare (Harper 1977). Studiind cinetica represiei enzimelor implicate în biosinteza histidinei, cu ajutorul unor mutante auxotrofe derepresate,

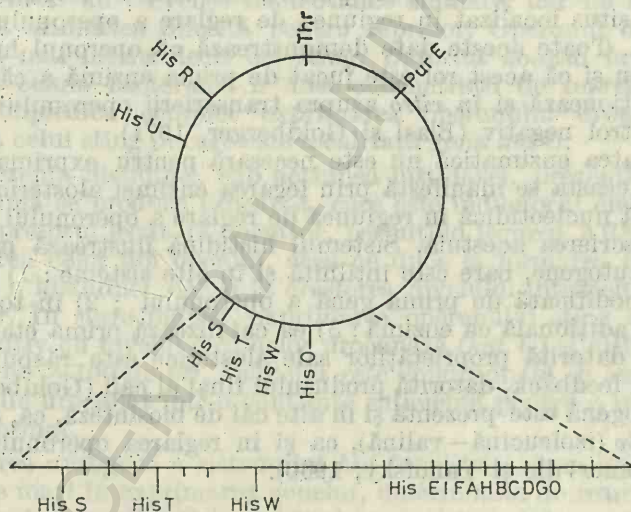


Fig. 315. — Harta genetică la *Salmonella typhimurium*, cu reprezentarea genelor *his* și a relațiilor lor cu genele căii treoninei (*Thr*). Cheia simbolurilor cistronilor: O — oper ator; his R — histidil/ARNt; W și T — gene structurale ale enzimelor de maturare a ARNt; G, D, C, B, H, A, F, I, E, S — gene structurale care codifică enzimele căii (după Brenner și Mes, 1971).

Goldberger și colab. (1966) au arătat că după adăugarea histidinei în mediu activitățile specifice ale enzimelor încep să scadă într-o succesiune definită. Mai precis, succesiunea în timp în care enzimele devin represate corespunde poziției lor în operonul *his*. În felul acesta, între represia enzimei fosforibozil pirofosfat ATP fosforilaza, care corespunde primei gene (G), și a celei de-a șaptea, corespunzând genei F, trec 10 minute. Deci, intervalul de timp necesar pentru ca o enzimă să fie represată este corelat direct cu distanța dintre gena respectivă și regiunea operator, localizată înaintea

genei *G* (Roth și colab., 1966). Ulterior, s-a demonstrat că această comportare poate fi anulată prin blocarea situsului alosteric al produsului primei gene, ca și prin mutațiile care o modifică structural, ca în cazul mutantelor insensibile la feedback.

Deoarece aceste modificări care perturbă efectul de reglare sint însoțite de păstrarea activității enzimatică s-a ajuns la concluzia că enzima care catalizează prima reacție a căii de biosinteză a histidinei joacă un rol direct în procesul de represie. Din cercetările lui Schlesinger și Magasanik (1964), precum și ale lui Roth și Ames (1966) se știa că reglarea operonului *his* necesită interacțiunea dintre prima enzimă necesară pentru biosinteza acestui aminoacid și ARNt^{his} aminoacilat (histidil-ARNt). Cercetările lui Kovacs, Goldberger și colab. (1973) au arătat, în plus, că prima enzimă își exercită acțiunea de represie nu local, la locul său de sinteză, ci acționează ca o moleculă liber difuzibilă. Ceva mai mult, s-a demonstrat capacitatea sa de a acționa la nivel genetic, deoarece este capabilă să interacționeze nu numai cu histidil-ARNt, ci și direct, cu anumite elemente de reglare din structura operonului *his*. Proba o constituie faptul că prima enzimă a căii de biosinteză pusă în contact — *in vitro* — cu genomul unui fag transductor Φ 80, care poartă operonul histidină se leagă de ADN bacterian la un situs localizat în regiunea de reglare a operonului *his* sau în apropierea ei. Toate aceste date demonstrează că operonul histidină este reglat autogen și că acest rol este jucat de prima enzimă a căii de biosinteză, care acționează și *in vitro* asupra transcrierii operonului, ca un element de control negativ (Blasi și Goldberger, 1971).

Activitatea enzimatică nu este necesară pentru exprimarea funcției de reglare. Aceasta se manifestă prin legarea enzimei alosterice de o anumită secvență nucleotidică în regiunea de reglare a operonului *his*, blocând specific transcrierea acestuia. Sistemul histidină ilustrează particularitățile reglării autogene, care este întilnită și în alte sisteme: 1) proteina de reglare este codificată de prima genă a operonului; 2) în toate cazurile are o funcție adițională ca enzimă; 3) ea catalizează prima etapă a căii de biosinteză și datorită proprietăților sale alosterice este răspunzătoare de inhibiția prin feedback, datorită produsului final al căii (Goldberger, 1974). Reglarea autogenă este prezentă și în alte căi de biosinteză, ca, de exemplu, în sistemul *ilv* (izoleucină—valină), ca și în reglarea operonului triptofan la *E. coli* (Somerville și Yanofsky, 1960).

Reglarea autogenă a operonului *hut*

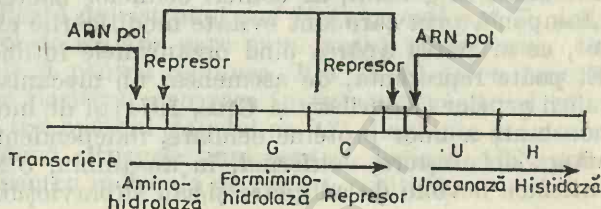
Magasanik și colab. (1971), precum și Hagen și Magasanik (1973) au demonstrat că sistemul de utilizare a histidinei (*hut*) de la *S. typhimurium* reprezintă exemplul cel mai tipic de reglare controlată autogen la bacterii. Calea constă din patru enzime, fiecare catalizând una din treptele de degradare a histidinei la acid glutamic, NH₃ și formamidă. Genele care codifică structura acestor enzime sint așezate contiguu, într-o mică regiune a cromosomului, cunoscută sub denumirea de genele *hut* („histidine utilizing”).

Ele sint organizate în doi operoni (fig. 316) inductibili, care sint reglați în mod coordonat prin acțiunea primului intermediar al căii meta-

bolice, urocanatul. Transcrierea celor doi operoni se realizează în aceeași direcție, începînd de la cele două situsuri promotor, care sînt probabil adiacente unor situsuri operator.

Reglarea autogenă se realizează prin intermediul produsului genei *hut C*, situată în operonul stîng, care codifică o proteină represor. În absența

Fig. 310. — Funcționarea operonului *hut* care asigură utilizarea histidinei la *Salmonella typhimurium* (după Priest, 1983).



inductorului din mediu represorul se leagă de regiunile operator și blochează complet transcrierea operonului drept, reducînd-o la un nivel scăzut pe aceea a operonului stîng. Acest fenomen este datorat faptului că cei doi operatori au secvențe nucleotidice similare, dar nu identice, fapt care explică afinitatea diferită pentru represor. Operonul drept îl leagă de 3—4 ori mai intens decît cel stîng. Datorită acestui fapt se asigură prezența în celula bacteriană a unei concentrații de represor suficientă pentru a împiedica complet exprimarea operonului drept, permițînd transcrierea celui stîng în care este localizată gena *hut C*.

În prezența histidinei, sub acțiunea histidazei, prezentă în cantitate mică, în celulă se produce urocanat, care este inductorul efectiv. El îndepărtează represorul legat de operator, permițînd legarea ARN polimerazei și transcrierea celor doi operoni, ceea ce duce la formarea enzimelor căii de utilizare a histidinei, dar și la creșterea nivelului intracelular al proteinei represor. În stare indusă, exprimarea operonului stîng crește de ~3 ori, comparativ cu nivelul enzimelor urocanază (*hut U*) și histidază (*hut H*) care crește de ~100 de ori. Inducția este condiționată în această fază de producerea de urocanat într-o cantitate suficientă pentru a inactiva represorul nou format.

Reglarea autogenă a sistemului *hut* funcționează ca un tampon față de variațiile mari în exprimarea genelor, determinate de reacția bacteriilor la condiții noi de mediu. Orice perturbare a sistemului care tinde să crească exprimarea operonului va produce o creștere a concentrației represorului, care se opune la răspuns. În felul acesta, reacția celulei la semnalul original de creștere a exprimării genelor va fi diminuată de răspunsul la semnal (Priest, 1983). Reglarea autogenă este implicată în menținerea stării de lizogenie a fagului lambda, prin efectul de reglare pozitivă a represorului asupra propriei sale gene structurale *c I*.

Condiția minimală pentru a eticheta un mecanism de reglare ca „autogen” include intervenția a trei factori: 1) demonstrarea faptului că proteina de reglare influențează exprimarea propriei sale gene structurale și nu numai exprimarea genelor structurale strîns legate de aceasta; 2) funcția de reglare a proteinei să fie independentă de funcția sa catalitică sau de altă funcție (proteină structurală, anticorp etc.), pe care o poate

avea; 3) proteina de reglare să nu fie implicată în transportul sau metabolismul inductorului sau copresorului. După Goldberger (1974), asocierea dintre prima genă, respectiv prima enzimă și reglarea mai multor sisteme de biosinteză a aminoacizilor nu reflectă o asociere fortuită; ei a apărut și s-a menținut în cursul evoluției, deoarece conferă organismului anumite avantaje selective. După Hagen și Magasanik (1973), fenomenul de reglare autogenă, în general, ar conferi celulelor bacteriene un sistem de control „tampon”, prin care sînt evitate modificările externe în exprimarea genelor, ce ar putea apărea cînd organismele întîlnesc condiții noi de mediu. El poate reprezenta, de asemenea, un mecanism de amplificare a exprimării genelor (Kourilsky și Gros, 1974) și de menținere a unei concentrații constante a unor proteine celulare, independent de mărimea celulei și de viteza de creștere, conferind, în ansamblu, o mai mare capacitate de a satisface nevoile de adaptare și/sau supraviețuire ale organismelor.

Reglonul

În unele cazuri, genele corespunzătoare unei anumite căi metabolice nu sînt adiacente. Jacob și Monod (1963) au considerat ipotetic că această situație nu este în conflict cu conceptul clasic de operon. Ei au sugerat posibilitatea existenței unor operoni multipli, fiecare compus din una sau mai multe gene structurale, care ar putea fi controlate — nu obligatoriu coordonat — de o singură genă de reglare.

Maas și Clark (1964) au descris sub denumirea de *reglon* (engl. „regulon”) sistemele reglate de o singură genă de reglare și care funcționează ca o unitate de control, deși sînt formate din gene structurale răsbindite în structura cromosomului. În multe cazuri, reglonii sînt alcătuiți din doi sau mai mulți operoni compleți cu eistroni structurali, promotori și operatori, supuși unui control negativ prin interacțiunea cu un represor unic. Aceasta implică prezența unui situs de recunoaștere unic repetat în toți operonii care formează reglonul. Ca urmare, spre deosebire de operoni, reglonii nu sînt transcriși la ARNm policistronic (control supraoperonic) (Reznikoff, 1972).

Un exemplu caracteristic este furnizat de reglonul maltozei de la *E. coli*, descris de Debarbouillé și Schwartz (1979). El este alcătuit din doi operoni denumiți *mal A*, și *mal B*, situați pe harta genetică a *E. coli* la 75, respectiv 91 minute (fig. 317). Ulterior, s-a demonstrat că fiecare din

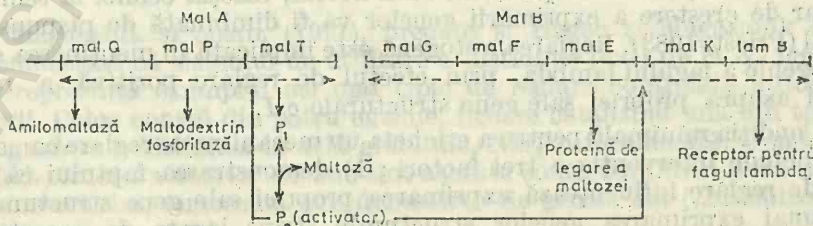


Fig. 317. — Reglonul maltozei la *E. coli*. Săgețile întrerupte indică direcțiile de transcripție a celor trei operoni *mal* (după Debarbouillé și Schwartz, 1979).

cei doi operoni — descriși mai recent sub denumirea de regiunile *Mal A* și *Mal B* — sînt în realitate alcătuiți din doi operoni mai mici.

Regiunea Mal A codifică enzimele de reglare și hidrolizante ale maltozei. Cistronul *Q* codifică amilomaltaza care hidrolizează maltoza la glucoză și un polimer de glucoză, care este ulterior hidrolizat la glucozo-1-fosfat, de o fosforilază codificată de cistronul *mal P*. Operonul *mal T* codifică o proteină activă cu rol de reglare, care promovează transcrierea atît pentru regiunea *Mal A*, cît și pentru regiunea *Mal B*. El are o funcție absolut necesară de reglare pozitivă, deoarece în prezența maltozei activează exprimarea celorlalți trei operoni (tabelul nr. 47). Regiunea promotor situată în operonul *T* are două situsuri: unul pentru legarea ARN polimerazei și cel de-al doilea pentru molecula de reglare pozitivă.

Tabelul nr. 47

Genele regionului maltoză de la *E.coli* și produșii lor proteici. Săgețile indică direcția transcrierii genetice (modificat, după Birge, 1981)

Regiunea, operonul sau cistronul	Poziția sau funcția fiziologică
Regiunea <i>Mal A</i> Operonul <i>mal T</i> ↓ <i>mal P</i> ↓ <i>mal Q</i>	(74 minute) Proteina de reglare pozitivă Maltodextrinfosforilaza Amilomaltaza
Regiunea <i>Mal B</i> Operonul 2 ↓ <i>mal G</i> ↓ <i>mal E</i> ↓ <i>mal F</i> Operonul 3 ↓ <i>mal K</i> ↓ <i>lam B</i>	(90 minute) Funcție necunoscută Proteina de legare a maltozei, Constituent esențial al maltozpermeazei Constituent esențial al maltozpermeazei Proteină receptoare a fagului lambda, proteină a membranei externe care facilitează transportul oligomaltozaharidelor prin această structură

Regiunea Mal B, alcătuită din 5 cistroni, conține, probabil, în întregime informația pentru transportul maltozei în celule. Cistronul *G* are o funcție încă necunoscută. Cistronul *K* este constituent esențial al maltozpermeazei, iar cistronul *E* codifică o proteină de legare situată în spațiul periplasmic. Cistronul *F* specifică o proteină de legare implicată în transport și situată în membrana externă, în timp ce cistronul *lam B* codifică o proteină situată în membrana externă a peretelui celular cu funcție dublă: 1) receptor al fagului lambda; 2) constituent al membranei externe a peretelui celular cu funcție de receptor primar al maltozei, ori de cîte ori concentrația acesteia este mai mică de 10^{-4} . Prin această ultimă funcție, ea ar favoriza transportul maltoz oligozaharidelor prin membrane. Situsul promotor al regiunii *Mal B* este situat între genele *mal E* și *mal K*.

Transcrierea genetică a regiunilor *Mal A* și *Mal B* are loc de la promotori în ambele direcții (transcriere divergentă). După Reznikoff (1972) și Birge (1981), prezența reglonului *mal* nu ar fi o excepție în rîndul uni-tăților de reglare, deoarece au fost descrise mai multe exemple, unele chiar cu o organizare mai complicată. Există, de asemenea, situații mai complexe, ca, de exemplu, prezența a doi regloni pentru controlul global al unei căi metabolice sau a unor structuri de tipul superreglonilor, în care doi regloni înrudiți fiziologic interacționează fie unidirecțional, fie reci-proc, în funcție de răspunsul la represori.

Diversitatea mecanismelor de reglare la bacterii

După cum s-a demonstrat, există o mare varietate de mecanisme efec-tive de reglare la bacterii și acest fenomen este considerat ca normal de majoritatea autorilor, ținîndu-se seama de apariția lor în timp. Astfel, se consideră că selecția evolutivă a proprietăților de reglare a fost ulte-rioară selecției proteinei enzimatice active, catalitice *per se*. Această afir-mație se bazează pe ideea că structura adițională, care dotează enzimele cu capacitatea de a răspunde la semnale de reglare, trebuie să fie compa-tibilă cu structura catalitică primitivă. Ca urmare, a existat tendința de a păstra orice structură apărută, care a permis o reglare eficientă a activi-tății enzimatice.

Aceasta face ca în prezent să existe posibilitatea ca aceeași cale metabolică identică la două grupuri de bacterii să fie supusă unor modali-tăți de reglare diferite, specifice pentru fiecare grup. Spre exemplu, meca-nismul de reglare a căii de biosinteză a aminoacizilor din familia aspartat, descris de *E. coli* și prezent la toate enterobacteriile, se bazează pe pre-zența aspartokinazelor multiple supuse controlului independent al produ-șilor finali. Acest mecanism este rar întîlnit la celelalte grupuri de bac-terii, la care acționează mecanisme alternative.

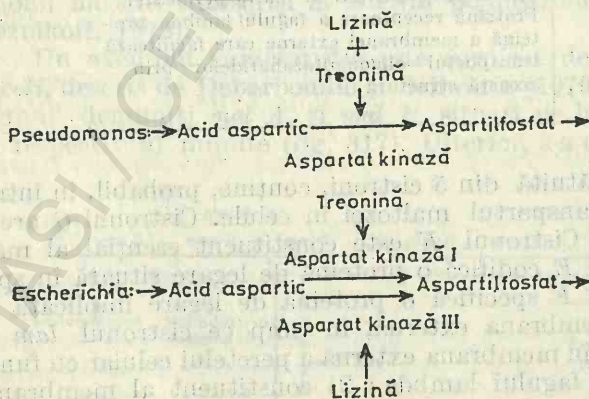


Fig. 318. — Două modali-tăți diferite de reglare alo-sterică a primei reacții din calea de biosinteză a ami-noacizilor derivați de la acid aspartic. La *Pseudo-monas*, reacția este me-diată de un singur tip de aspartatkinază supusă in-hibiției prin feedback con-cerțată de către lizină și treonină. La *Escherichia*, două din cele trei aspar-tatkinaze sint supuse in-hibiției prin feedback se-parat, prin lizină și res-pectiv prin treonină.

Cele mai multe bacterii examinate sintetizează numai o singură aspartokinază, care este supusă însă, după cum s-a demonstrat la *Pseudo-monas*, unui mod de inhibiție prin produs final mult mai complex (fig. 318).

Activitatea acestei enzime este puțin afectată de prezența separată a lizinei sau o treoninei. În prezența ambilor aminoacizi, inhibiția este rapidă și foarte marcată. Cei doi produși finali, cu rol de efectori alosterici, produc împreună o modificare conformațională pe care nu o poate produce separat nici unul din ei. Fenomenul este numit *inhibiție concertată prin produs final*.

Deși reglarea este diferită, din punct de vedere fiziologic, cele două procese, inhibiția independentă și inhibiția concertată, au același efect, deoarece afectează enzime izofuncționale (izoenzime): împiedică produsul final al unei ramificații a căii metabolice să întrerupă fluxul metaboliților în alte ramuri.

Evoluția mecanismelor de reglare

Cunoștințele actuale referitoare la mecanismele de reglare demonstrează că bacteriile dispun de o mare și subtilă capacitate de autoreglare, realizată printr-o rețea complexă de circuite de feedback. Acestea au apărut în celula primitivă, ca răspuns la presiunea constantă a evoluției, pentru a crește și a se adapta mai rapid la mediu. Deși organizarea operonilor nu este uniformă, prezentind uneori, deosebiri marcante, ei funcționează în prezent ca entități structurale, bine adaptate pentru reglarea coordonată a unor cistroni funcțional înrudiți. Modul în care s-au format este necunoscut.

Presupunând că diferiți cistroni au apărut la organismele primitive în urma unor evenimente mai mult sau mai puțin întâmplătoare, este greu de explicat cum s-au grupat într-un anumit segment cromosomal mai multe gene, implicate în aceeași cale metabolică. După Davis și colab. (1969), se poate presupune că atunci când un astfel de aranjament grupat s-a realizat, probabil, întâmplător, el s-a stabilizat și a fost păstrat de-a lungul evoluției, deoarece a dotat organismul respectiv cu o valoare adaptativă superioară. Diferite particularități ale creșterii microorganismelor actuale sugerează semnificația teleonomică a proceselor de reglare și modul în care pot explica menținerea lor sub acțiunea presiunii selecției. S-a demonstrat astfel că, bacteriile cultivate în bulion se adaptează printr-un număr mare de răspunsuri prin feedback și produc o cantitate de masă celulară de trei ori mai mare decât în mediile minimale. Utilizarea preferențială a aminoacizilor preformați din mediu reprezintă o economie în metabolismul celulei. Blocarea sintezelor endogene permite ca resursele acesteia de energie, C, N etc. să fie dirijate spre producerea rapidă a altor compuși sau structuri (ca, de exemplu, ribosomii), a căror lipsă ar putea limita rata creșterii. În general, deci, reglările prin feedback stimulează eficiența creșterii. Dacă biosintezele nu ar fi armonizate și o parte din nutrienți ar fi risipiți pentru sinteza excesivă a unor metaboliți sau macromolecule creșterea ar fi perturbată.

Jocul mecanismelor de represie și derepresie are o importanță deosebită în adaptarea celulelor la prezența sau la epuizarea unui nutrient din mediu. S-a demonstrat astfel că *E. coli* cultivată pe un mediu minimal formează enzimele unei căi biosintetice cu o viteză constantă pe uni-

tate de proteină sintetizată, menținând constant nivelul „normal” al enzimelor respective. Cînd se adaugă produsul final al căii respective, enzimele nu mai sînt produse, nivelul lor scade exponențial și după cîteva generații devine neglijabil. Dacă produsul final respectiv este epuizat și celulele sînt lipsite brusc de un nutrient specific, creșterea bacteriei încetează temporar și derepresia care urmează este asociată cu sinteza preferențială a enzimelor necesare, cu o viteză care depășește de 25—50 de ori viteza normală (raportată la cantitatea totală de proteină sintetizată). După ~ 10 minute, cînd enzimele ajung concentrația normală, viteza sintezei lor revine la normal, probabil prin atingerea concentrației produsului final față de care este adaptată funcționarea sistemelor de reglare. Sinteza preferențială a enzimelor necesare demonstrează existența unei capacități de rezervă pentru o sinteză mai rapidă, selectivă, a unor proteine și explică reluarea promptă a creșterii celulelor bacteriene.

Importanța reglării metabolice pentru biologia bacteriilor

Descoperirea mecanismelor de reglare genetică a metabolismului bacterian a furnizat explicația extraordinarei capacități a acestor organisme de a se adapta la medii noi și de a utiliza cu mare eficiență resurse nutritive dintre cele mai diferite. Grație acestor mecanisme, celula bacteriană nu risipește niciodată substanțele nutritive sau energia în sinteze inutile, ci produce întotdeauna metaboliți intermediari și enzime în cantități echilibrate.

În cursul proceselor de metabolism bacterian trebuie reglate corect trei tipuri de activități :

- 1) influxul și efluxul de substanțe, adică trecerea unor compuși în și din celulă, în vederea stabilirii și menținerii lor în concentrații corespunzătoare nevoilor metabolice ale celulei;

- 2) coordonarea treptelor individuale ale fiecărei secvențe de reacții enzimatice, pentru împiedicarea unei acumulări de produși intermediari;

- 3) coordonarea armonioasă a diferitelor căi metabolice, pentru menținerea integrității sistemului ca atare, deoarece predominanța excesivă a uneia dintre aceste căi poate perturba echilibrul întregii economii celulare.

Grație proceselor de reglare, căile metabolice ale bacteriilor sînt ajustate precis nevoilor organismului lor, care în mare măsură sînt condiționate de compoziția mediului. Dacă nu survin restricții majore în ceea ce privește exigențele respiratorii, termice sau nutritive specifice unei tulpini date, dublarea numărului de celule este dictată de vitezele de influx ale metaboliților, de producerea de energie și de efluxul metaboliților din celulă. Astfel, sinteza enzimelor necesare metabolismului energetic este reglată de prezența și concentrația diferitelor surse de energie din mediu, iar producerea enzimelor implicate în sinteza unui metabolit esențial este controlată de concentrația intracelulară a acestui metabolit, indiferent dacă proveniența lui este endogenă sau exogenă. În plus, prin intermediul mecanismelor de reglare genetică, celula bacteriană își ajus-

tează la nevoile sale metabolice nu numai sinteza enzimelor, ci și nivelul de activitate a acestor catalizatori biologici. Pentru realizarea unei reglări adecvate a dinamicii sale metabolice, celula bacteriană dispune de un sistem complex de transmițători și receptori de semnale chimice specifice prin intermediul cărora aparatul său genetic, răspunzător de ansamblul manifestărilor vitale este „informat” în permanență asupra nevoilor celulare și asupra posibilităților efective de reglare a biosintezei. Aceasta se datorește faptului că genomul bacterian conține nu numai informația genetică necesară efectuării diferitelor sinteze specifice, ci și planul desfășurării lor coordonate, ceea ce asigură supletea, deci „adaptabilitatea” întregului sistem. Grație „informatoarelor” săi chimici intracelulari, celula bacteriană „știe” în orice moment ce componenți să sintetizeze și cit din fiecare, pentru ca dezvoltarea ei să fie cât mai economică, poate să „recunoască” substanțele nutritive și să „comande” elaborarea numai a acelor enzime care îi sînt efectiv necesare la un moment dat.

Valoarea posibilităților de adaptare ale celulei bacteriene o demonstrează fiziologia deficitară a mutantelor „neinteligente”, izolate de Jacob și Monod (1963). Aceste mutante sînt incapabile să-și ajusteze sintezele după necesități și, ca atare, produc diferite proteine celulare în cantități mari, chiar atunci cînd nevoile celulei sînt mici sau de-a dreptul nule. Ca urmare, risipa de energie cheltuită în acest fel scade în mod evident viteza de creștere a unor asemenea mutante.

Un rol esențial în declanșarea mecanismelor de reglare îl are concentrația diferiților metaboliți în mediul intern al bacteriilor, concentrație care, la rîndul său, depinde, în cazul compușilor exogeni, de viteza pătrunderii lor în celulă. Intrarea coordonată în acțiune a diferitelor mecanisme de reglare asigură bacteriilor posibilitatea ca, în limitele programului lor genetic specific, să dea un răspuns adecvat și foarte rapid la modificările compoziției chimice intracelulare. Pentru a folosi o analogie cu limbajul, informația înscrisă în genom ar fi echivalentă unui text a cărui citire ar fi reglată de mecanisme indicînd ce frază sau ce pasaj trebuie citit la un moment dat, în funcție de anumite necesități operaționale de moment, impuse de executarea instrucțiunilor conținute în text. În concluzie, prezența în mediu a produsului unei căi anabolice face inutilă sinteza lui intracelulară: produsul anabolic adăugat, exogen, este folosit preferențial și astfel sinteza tuturor enzimelor care asigură producerea lui endogenă nu mai este necesară și, ca atare, este blocată prin represie. Pe de altă parte, chiar în cazul cînd sinteza unor enzime a fost blocată prin represie, activitatea în continuare a enzimelor respective deja existente în celulă ar fi, de asemenea, neeconomică, întrucît permite acumularea mai departe a produsului anabolic devenit inutil. Ca atare, ea este împiedicată prin mecanismul de reglare fină reprezentat de *retroinhibiție*. În fiecare secvență metabolică există o enzimă reglatoare care este, în general, cea dintîi din secvența respectivă. Dacă produsul final al secvenței este prezent în mediu, el inhibă puternic, specific și foarte rapid activitatea enzimei care catalizează prima reacție a secvenței și, pe această cale, blochează în mod indirect și treptele enzimatice următoare, care sînt private de substratele lor specifice, metaboliți intermediari ai secvenței respective.

Tot ca urmare a unor procese de reglare genetică, în contact cu un mediu nou sau modificat, care conține, de exemplu, o sursă de C neutilizată anterior, bacteriile sint capabile ca prin *inducție* să realizeze o sinteză rapidă *de novo* a enzimelor necesare pentru utilizarea acestui nou substrat, înainte ca viabilitatea lor să fi fost afectată.

În esență deci, celula bacteriană dispune de două tipuri de mecanisme reglatoare: 1) *mecanisme cu acțiune rapidă*, de control fin, care nu lucrează asupra sintezei enzimelor, ci direct asupra activității lor: procesele de retroinhibiție; 2) *mecanisme cu acțiune întârziată*, de control mai larg, mai grosier, care intervin atunci când în compoziția mediului apar modificări mari, impunând un anumit timp de latență pentru manifestarea răspunsului metabolic al celulei. Aceste mecanisme controlează viteza cu care se formează enzimele căilor metabolice și determină fie inițierea sintezei *de novo* a unor enzime (*inducție*), fie încetarea temporară a sintezei altora (*represie*). Datorită intervenției lor, un sistem enzimatic este *prezent* atunci când necesitatea degradării unui substrat sau exigențele unei biosinteze o cer și *absent* atunci când activitatea sa catalitică nu este necesară. Adaptarea prin asemenea mecanisme nu este de tip „totul sau nimic”, deoarece pentru satisfacerea unor nevoi intermediare reglarea se poate face și ea la un nivel intermediar, și anume acela al concentrației enzimelor. Un proces similar intervine și în cazul sintezei proteinelor structurale: dacă bacteriile cresc cu viteză maximă, ribosomii reprezintă 25—30% din masa celulară, în timp ce în condiții nefavorabile de creștere conținutul în ribosomi al celulei poate să scadă pînă la a reprezenta doar 20% din cantitatea lor maximă posibilă. Răspunsul metabolic rapid prin retroinhibiție permite o adaptare imediată a celulei individuale la modificarea condițiilor mediului, în timp ce reglarea funcționalității enzimatice a celulei prin represie — proces care determină o adaptare mai puțin promptă la variațiile mediului — este eficientă mai curînd la nivelul populației bacteriene pe cale de creștere, decît la nivelul individului celular. În lipsa retroinhibiției, biosinteza produsului final al unei secvențe enzimatice ar continua pînă cînd numărul moleculelor de enzime deja elaborate în momentul blocării sintezei acesteia ar fi suficient micșorat în fiecare celulă în urma diviziunilor celulare succesive prin care se realizează multiplicarea bacteriilor.

Cercetarea mecanismelor de reglare a permis îmbogățirea cunoștințelor de biologie în general. Ele au evidențiat, în primul rînd, existența și răspîndirea largă a proteinelor alosterice, ale căror conformație și activitate reglează expresia genelor, modulînd răspunsul față de un anumit substrat chimic. S-a demonstrat, de asemenea, că reglarea biosintezei macromoleculelor specifice se face mai ales controlînd frecvența de inițiere a formării lor și nu prin controlul vitezei de creștere a lanțului polipeptidic. În sfîrșit, aceste cercetări au demonstrat că gruparea genelor în structura cromosomului are pe lîngă avantajul echipartiției materialului genetic în momentul diviziunii și pe cel — probabil egal de fundamental — de funcționare a operonilor, ca unități principale de reglare. În același timp, cunoașterea aprofundată a mecanismelor prin care celulele își adaptează sintezele la exigențele mediului extern și ale celui intracelular permite fie producerea unor cantități importante din anumite proteine utile, fie împiedicarea unor sinteze anarhice.

INGINERIA GENELOR

„Ingineria genelor nu este altceva decât o serie de metode complexe, dar bazate pe principii simple, prin care anumite gene sau grupuri de gene sînt extrase dintr-o celulă și introduse în alta, în care se pot lega de genele existente, contribuind la determinarea proceselor biochimice ale acestora”.

J. FREEDLAND-JUDSON

„Aplicațiile potențiale ale tehnicilor de ADN recombinant sînt limitate numai de imaginația celor care le folosesc”.

J. JOHNSON

the following studies of various types of bacteria in the
laboratory of the American Medical Association, and the
results of the studies of the various types of bacteria
in the laboratory of the American Medical Association.

In the laboratory of the American Medical Association,
the following studies of various types of bacteria in the
laboratory of the American Medical Association, and the
results of the studies of the various types of bacteria
in the laboratory of the American Medical Association.

The following studies of various types of bacteria in the
laboratory of the American Medical Association, and the
results of the studies of the various types of bacteria
in the laboratory of the American Medical Association.

The following studies of various types of bacteria in the
laboratory of the American Medical Association, and the
results of the studies of the various types of bacteria
in the laboratory of the American Medical Association.

The following studies of various types of bacteria in the
laboratory of the American Medical Association, and the
results of the studies of the various types of bacteria
in the laboratory of the American Medical Association.

Izolarea genelor lac

(Pl. 32)

Cunoașterea structurii moleculare și genetice a *E. coli* și a fagilor săi, precum și descifrarea interacțiunilor complexe dintre această bacterie și fagul λ au permis izolarea operonului *lac*, realizare de mare performanță, considerată de mulți cercetători ca marcind începutul preocupărilor de inginerie a genelor. În acest scop, Shapiro, Beckwith și colab. (1969) au izolat un segment mare din genele *lac*, limitat la genele *p*, *o* și *z*, pentru a evita contaminarea cu alte porțiuni de gene adiacente. În acest scop au utilizat doi fagi transductori strâns înrudiți, lambda și Φ 80, care au hărți genetice similare, suferă recombinații genetice în cursul infecțiilor mixte și se inseră în cromosomul bacterian în aceeași orientare.

Fagul λ *plac* 5 poartă genele *lac* bacteriene inserate în ordinea *y z o p i*, în raport cu genele fagice *A* și *R*. Genele *p o z* sint integrale, în timp ce genele *y* și *i* sint prezente în formă incompletă datorită unor deleții, iar gena *a* lipsește integral. Prin denaturare, ADN *plac* 5' este scindat în două catene: 1) catena „greă” H (heavy = greu), avind o proporție mai mare de baze G și C, și 2) catena L „ușoară” (light = ușor), care pot fi separate prin ultracentrifugare. Dintre cele două catene, numai catena ușoară formează hibrizi moleculari cu ARNm, ceea ce demonstrează că ea poartă informația genetică „sens” *lac*, în timp ce catena H este complementară și necodificatoare.

Fagul Φ 80 *plac* 1 poartă informația genetică corespunzătoare cistronilor *i*, *p*, *o*, *z*, *y* din operonul *lac*, *y* fiind însă incomplet. La acest fag, informația genetică (sens) este purtată de catena H. Cei patru cistroni sint integrați în genomul fagului Φ 80, într-o orientare inversă în raport cu cea din fagul λ (fig. 319).

Pentru izolarea operonului *lac*, Shapiro și Beckwith s-au bazat pe următoarele proprietăți ale secvențelor nucleotidice ale celor doi fagi: 1) catena H λ și catena Φ 80 sint foarte asemănătoare și sint lipsite de complementaritate. În schimb, secvențele nucleotidice bacteriene *lac* de pe cele două catene H sint perfect complementare în direcții antiparalele datorită orientării lor în sens invers în cursul integrării. Astfel, catena H λ conține secvența 3'TCAAGC 5', în timp ce catena H Φ 80 are o secvență complementară în ordine inversă (5' AGTTGG3'). Datorită acestei structuri, cind catenele H ale celor doi fagi transductori *lac* sint puse în condiții de renaturare vor forma un duplex stabil numai la nivelul secvențelor *lac* complementare, în timp ce secvențele fagice necomplementare

vor rămâne neimperecheate, monocatenare. Ele pot fi eliminate cu ajutorul unei endonucleaze specifice pentru ADN monocatenar, păstrând numai zona centrală a operonului, respectiv regiunea promotor (p) la nivelul

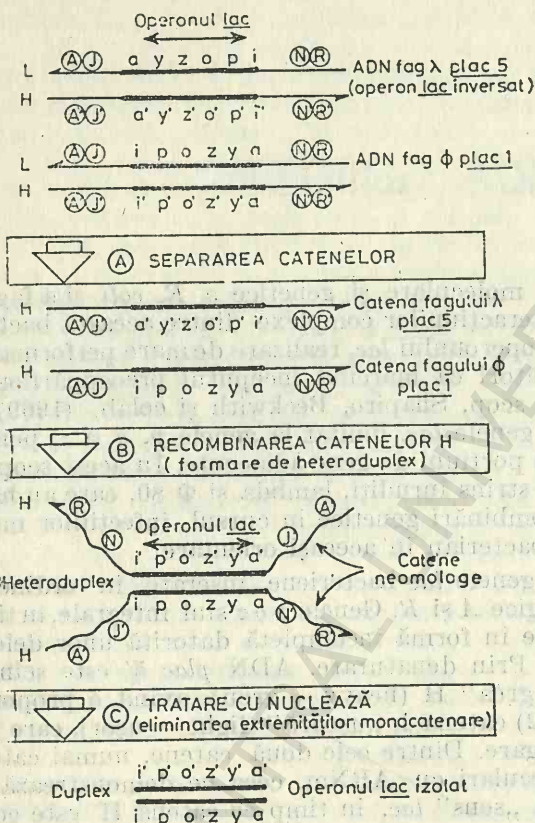


Fig. 319. — Reprezentarea schematică a fazelor procesului de izolare și purificare a operonului lactoză. A, J, N, R — markeri cromosomali.

căreia începe transcrierea, operatorul (o) la nivelul căreia aceasta poate fi blocată și gena structurală z pentru β -galactozidază. Segmentul astfel izolat are o lungime de $1,4 \mu\text{m}$, din care $\sim 1,26 \mu\text{m}$ corespund genei z ($\sim 3700 \text{ pb}$) și $0,14 \mu\text{m}$ ($\sim 410 \text{ pb}$) regiunilor p și o .

Restricție și modificare

„Activitatea nucleazelor de restricție nu numai că ne permite să construim molecule de ADN recombinant și să analizăm genele individuale, dar ne-a condus într-o eră nouă, cea a „biologiei sintetice”, în care sînt descrise și analizate nu numai genele existente ci, de asemenea, pot fi construite și valorificate noi aranjamente de gene”

W. SZYBALSKI

Moleculele de ADN „străin” care pătrund în celulele bacteriene prin infecție sau prin transfer de material genetic au mai multe posibilități de evoluție :

1) Se pot replica autonom — ca în cazul fagului virulent sau al fagilor temperați în cursul inducției litice — declanșînd, în același timp, programul de distrugere al celulei-gazdă.

2) Se pot replica fizic autonom, în cazul plasmidelor, sau după recombinație cu un replicon preexistent, în cazul plasmidelor cu funcții episomale, al integrării fagilor temperați ca profagi (la bacteriile lizogene), sau după transfer de material genetic (în transformarea genetică, transducție, conjugare etc.).

3) Se „diluează” în cursul multiplicării populației bacteriene, fără să se replice, în cazul transducției abortive sau în cel al infectării unei bacterii imune de către un fag temperat etc.

Toate aceste modalități de evoluție sînt condiționate de menținerea nealterată a informației genetice exogene.

Numeroase fapte de observație au demonstrat însă, că moleculele de ADN „străin” cromosomal, plasmidial sau fagice, care pătrund destul de frecvent în celulele bacteriene, dispar foarte adesea rapid după ce au fost introduse și celula își menține constantă informația genetică proprie, normală. Aceste observații au sugerat posibilitatea existenței unor mecanisme capabile să „recunoască” moleculele străine de ADN și să determine îndepărtarea lor din celula bacteriană.

Descoperirea fenomenului de restricție și modificare. În forma sa cea mai evidentă, acest fenomen a fost descris de Luria și Human (1952), precum și de Bertani și Weigl (1953), cu ocazia studiului interacțiunilor dintre infecția fagică și specificitatea gazdei, care a evidențiat o comportare curioasă a fagilor λ cultivați pe două tulpini diferite de *E. coli*. Astfel, s-a demonstrat că particulele de fag λ obținute prin infecția *E. coli* K12, și denumite în consecință fagi $\lambda \bullet K$, se replică cu mare eficiență în celulele de *E. coli* K12, dar sînt, în general, incapabile să se replice în celulele de *E. coli* K12 (P1), care sînt lizogene, deoarece poartă în genomul lor profagul P1. Dacă fagii $\lambda \bullet K$ infectează bacteria *E. coli* K12 (P1), se eliberează numai un număr foarte limitat de fagi, numiți $\lambda \bullet K(P1)$, care au reușit să depășească „bariera” reprezentată de noua celulă-gazdă. Fagii $\lambda \bullet K(P1)$ se pot replica în continuare cu mare eficiență atît în celulele lizo-

gene (*E. coli* K12 (P1)), cît și în cele normale, nelizogene (*E. coli* K12), (fig. 320). S-a ajuns la concluzia că prezența profagului P1 era cea care, în același timp, limita creșterea celor mai mulți fagi de tipul λ -K în bac-

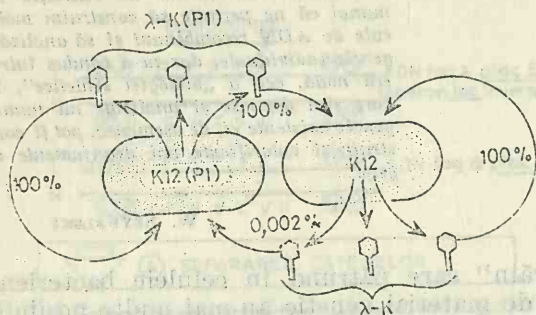


Fig. 320. — Restricția și modificarea fagului λ în *E. coli* K 12 (P1). Intensitatea punctării fagilor indică structura celor, a căror specificitate este determinată de celula-gazdă, în care a fost replicat fagul respectiv, punctată similar. Procentajele indică eficiența formării de plaje de liză cînd infectează tipul de gazde indicate prin săgeți (după Bertani și Weigle, 1953).

teria *E. coli* K12 (P1) și asigura „modificarea” celor cîteva particule rare, care reușeau să scape de această limitare. Dacă un singur fag modificat λ -K (P1), insensibil la fenomenul de restricție, infectează o bacterie *E. coli* K12 nelizogenă, se eliberează $\sim 150-250$ de particule fagice, care se multiplică foarte eficient, în continuare, în *E. coli* K12, dar au pierdut capacitatea de a crește pe *E. coli* K12 (P1). Numai foarte rare particule (~ 1 per centru infecțios) păstrează caracterul λ -K(P1) și capacitatea de a se replica nerestricțiv (nelimitat) pe tulpinile de *E. coli* K12 (P1).

Aceste date demonstrează că fagul replicat pe o anumită tulpină bacteriană este limitat („restricted”) în dezvoltarea pe o tulpină diferită și invers. Cîteva fagi „scapă” însă totdeauna de această limitare („restricție”) și se pot dezvolta bine în noua gazdă. Ei au suferit un fel de „modificare” specifică pentru gazda respectivă, care îi protejează de mecanismele de restricție ale acesteia.

Analizînd proprietățile sistemului fago-bacterian, Luria (1953) a ajuns la concluzia că acest fenomen ar avea un mecanism celular, fiind mai degrabă o caracteristică a bacteriei-gazdă decît a fagului și a propus denumirea de *modificare de către gazdă* („host modification”). Fenomenul de restrîngere a spectrului de gazde a fagilor a fost confirmat pentru fagul λ și cuplul de bacterii *E. coli* K12 și *E. coli* B de către Arber și Dussoix (1962), care au explicat și bazele sale moleculare. Ei au demonstrat că eficiența formării de plaje depinde de natura tulpinii bacteriene în care fagul a fost replicat ultima oară. Astfel, particulele de fag λ produse prin replicare în celule de *E. coli* K12, dispersate pe suprafața plăcilor însăși mințate cu tulpina omologă *E. coli* K12, formează plaje de liză cu o eficiență egală cu 1,0, în timp ce dispersate pe culturi de *E. coli* tulpina B produc plaje numai cu o eficiență de 1×10^{-4} *. Dacă, ulterior, cele cîteva-

* Eficiența formării de plaje („plating efficiency”) reprezintă raportul dintre numărul particulelor fagice dedus prin numărarea plăcilor de liză produse după însămînțare pe o tulpină indicatoare și numărul fagilor obținut prin determinarea fizică (numărare) la microscopul electronic, respectiv numărul de centri infecțioși produși per particulă fagică. O eficiență egală cu 1,0 înseamnă că fiecare particulă fagică determină o infecție productivă și, deci, produce o plajă după infecția unei celule bacteriene. O eficiență egală cu 1×10^{-4} înseamnă că numai o particulă din 10^4 poate produce o infecție productivă cu liză, după infectarea celulelor-gazdă.

Tabelul nr. 48

Eficiența formării plajelor de către fagul λ după infecția *E. coli* K12 și *E. coli* B

Bacteria-gazdă în care a fost replicat fagul	Eficiența formării plajelor pe	
	<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> B
<i>E. coli</i> K12	1,0	1×10^{-4}
<i>E. coli</i> B	4×10^{-4}	1,0

particule fagice eliberate cu frecvență foarte mică de celulele de *E. coli* B sint analizate, prin același test, proprietățile lor sint modificate în mod invers (tabelul nr. 48) și anume, ele formează plaje cu o eficiență mare (1,0) pe tulpina omologă B, (în care au fost replicate și anterior) și numai cu o eficiență foarte mică (4×10^{-4}) pe tulpina heterologă *E. coli* K12.

Cercetările menționate sugerează că rarii fagi progeni $\lambda \bullet K(P1)$ nerestricțivi, produși de *E. coli* K12, dătoresc acest caracter transferului unui anumit material de la fagii parentali $\lambda \bullet K(P1)$. Pentru a demonstra natura acestui material, Arber și Dussoix (1962) au infectat bacteria *E. coli* K12, nelizogenă, cu fagi $\lambda \bullet K(P1)$ nerestricțivi, marcați „greu” cu D_2O , și au măsurat densitatea populației fagice progene după un singur ciclu de creștere (fig. 321).

Fig. 321. — Transferul specificității de gazdă a fagilor nerestricțivi $\lambda \bullet K(P1)$, printr-un ciclu de replicare pe *E. coli* K12. O cultură de *E. coli* K12 nelizogenă, obținută pe medii cu apă obișnuită, este infectată cu fagi $\lambda \bullet K^*(P1)$, marcați cu D, proveniți dintr-o cultură de *E. coli* K12 (P1) în mediu cu D_2O , într-un raport de 0,01 fagi per celulă. După o oră de la infecție, bacteriile lizate eliberează ~ 80 fagi $\lambda \bullet K$ și 0,5 $\lambda \bullet K(P1)$ per celulă. Populația de fagi progeni este centrifugată în gradient de CsCl. Picăturile colectate de la fundul tubului de centrifugă sint testate pe bacteriile K 12 (P1) pentru conținutul în fagi λ nerestricțivi (○) și conținutul total de fagi (●) pe *E. coli* K12 (după Arber și Dussoix, 1962).



În timp ce populația de fagi $\lambda \bullet K$ progenă cu caracter restrictiv apare ca integral „ușoară” după sedimentarea în gradient de CsCl, cele câteva particule fagice de tip $\lambda \bullet K(P1)$ prezente printre fagii progeni sint „grele”. Ele ocupă în gradientul de densitate de CsCl o poziție care corespunde unei densități de $\sim 1/4$ din conținutul în deuteriu al fagilor parentali $\lambda \bullet K(P1)$ deuterati integral inițial. Concluzia este că fiecare dintre rarii fagi $\lambda \bullet K(P1)$ nerestricțivi poartă în genomul lor jumătate din ADN parental, respectiv una din cele două catene replicate semiconservativ. Deși fagii

$\lambda \bullet K$ (P1) poartă jumătate din ADN parental, ei conțin numai 1/4 din D_2O parental. Restul este legat de proteina fagică parentală, care reprezintă ~ jumătate din masa fagului și rămîne, după infecție, în afara celulei bacteriene.

Arber și Dussoix (1962) au ajuns la concluzia că dependența spectrului de gazde de natura tulpinii bacteriene în care fagul a suferit ultimul său ciclu de replicare este datorită unei *modificări adaptative*, care este mai mult fenotipică decît genetică. Această particularitate este integral distinctă de gradul de extindere mutațională a spectrului de gazde fagic. Observația că ADN fagic marcat radioactiv este degradat în celulele nepermise în fragmente cu greutate moleculară mică, la scurt timp după infecție, sugerează că, alături de *modificare*, degradarea nucleolitică (*restricția replicării*) face parte din același sistem.

Fenomenul de restricție și modificare demonstrează că particulele fagice pot infecta cu succes numai tipul de celule-gazdă în care ADN a fost produs și replicat. În alte tipuri de celule, el se comportă ca un ADN străin, care, în imensa majoritate a cazurilor, nu poate produce o infecție productivă urmată de liză, deoarece este atacat de o serie de enzime specifice „de restricție” care inițiază degradarea ADN „străin”. Datorită fenomenului de restricție, fagul este foarte infecțios pentru o bacterie sensibilă numai dacă provine de la o tulpină identică. În cazul în care provine de la o tulpină diferită, infecțiozitatea este extrem de slabă. Cu toate acestea, restricția nu este absolută. Cele cîteva genomuri care scapă atacului enzimelor de restricție sînt „modificate” în noua gazdă și devin foarte infecțioase numai pentru ea, deoarece sînt imune față de sistemul de restricție al acesteia, dar rămîn sensibile față de enzimele de restricție ale primei bacterii-gazdă (fig. 322).

Fenomenul de restricție și modificare este controlat de celula-gazdă și se manifestă față de orice tip de ADN străin, indiferent de proveniența lui. Gradul de restricție este reflectat în numărul de situsuri de restricție prezente pe molecula de ADN, adică de numărul de situsuri expuse activității endonucleolitice a enzimei de restricție. În felul acesta s-a ajuns la ipoteza că fenomenul de restricție (restringerea capacității de replicare a ADN „străin” în anumite bacterii-gazdă) și cel de modificare, controlate de gazdă, reflectă existența a două funcții, aparent separate și distincte, determinate de prezența a două enzime cu specificitate identică:

- 1) *Enzimele de restricție*, care recunosc scurte secvențe din molecula de ADN, pe care le clivează în fragmente nefuncționale de diferite lungimi. Prin acest mecanism, informația genetică din celula bacteriană-gazdă este protejată, iar ADN străin este distrus.

- 2) *Enzimele de modificare*, care recunosc aceleași secvențe și le modifică în așa fel încît nu mai pot fi clivate de endonucleazele specifice ale gazdei. Ulterior, s-a demonstrat că nu numai infecția fagică, ci și conjugarea, transducția fagică, transformarea genetică, transfecția etc. sînt supuse fenomenelor de restricție și modificare. Arber (1972), precum și Smith și Arber (1972) au emis ipoteza că sistemul de restricție și modificare ar reprezenta un mecanism protector pentru celulele bacteriene contra ADN „străin” provenit de la exterior. El ar avea o funcție echivalentă sistemului imunitar descris la eucariote.

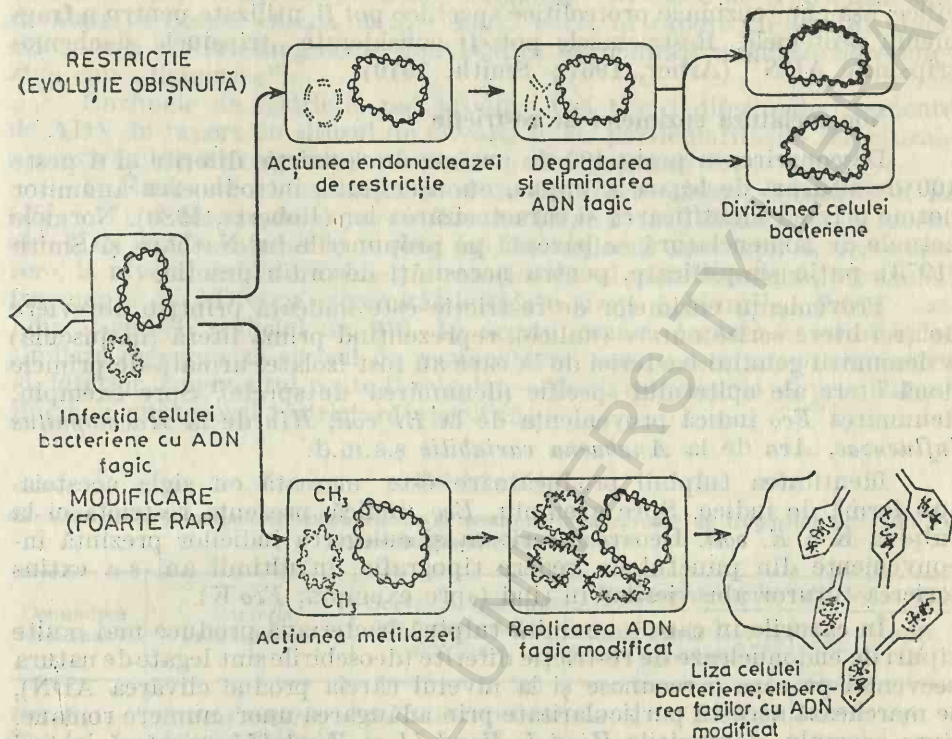


Fig. 322. — Cele două posibilități de evoluție a infecției fagice în celulele bacteriene posesoare de sisteme de restricție și modificare.

Endonucleazele de restricție

Nucleazele de restricție sau restrictazele („restricting enzymes”) sînt endodezoxiribonucleaze care hidrolizează specific moleculele de ADN d.c. după „recunoașterea” unei șevente nucleotidice specifice, prin clivarea a două legături fosfodiester — situate cite una pe fiecare catenă a moleculei — determinînd producerea unui număr limitat de fragmente per moleculă. În celulele de origine, endonucleazele de restricție fac parte integrantă dintr-un sistem de restricție și modificare, alcătuit dintr-o restrictază și o enzimă de modificare asociată, care recunoaște și modifică (în general, prin metilare) aceeași șeventă nucleotidică a ADN, recunoscută de endonucleaza de restricție. „Modificarea” protejează ADN celular de restricție, în timp ce ADN „străin” provenit de la exterior, lipsit de o modificare adecvată, sensibil la distrugerea prin endonucleaze de restricție, este clivat și degradat, în continuare, de alte enzime la monomerii constitutivi (Nathans și Smith 1975; Arber, 1977; Old și Primrose, 1980).

Datorită acestor proprietăți, endonucleazele de restricție pot fi utilizate și *in vitro*, pentru a cliva moleculele de ADN d.c. în fragmente spe-

cifice, așa cum enzimele proteolitice specifice pot fi utilizate pentru a fragmenta proteinele. Restrictazele pot fi considerate „tripsinele și chemotripsinele ADN” (Arber, 1967; Smith, 1979).

Nomenclatura enzimelor de restricție

Descoperirea a peste 400 de enzime de restricție diferite și a peste 100 de situsuri de legare a impus, cu necesitate, introducerea anumitor norme privind identificarea și caracterizarea lor (Roberts, 1980). Normele actuale de nomenclatură se bazează pe propunerile lui Nathans și Smith (1973), puțin simplificate, pentru necesități de ordin practic.

Proveniența enzimelor de restricție este indicată printr-o abreviere de trei litere scrise cursiv (italice), reprezentând prima literă (majusculă) a denumirii genului bacteriei de la care au fost izolate, urmată de primele două litere ale epitetului specific (denumirea de specie). Spre exemplu, denumirea *Eco* indică proveniența de la *E. coli*, *Hin* de la *Haemophilus influenzae*, *Ava* de la *Anabaena variabilis* ș.a.m.d.

Identitatea tulpinii producătoare este marcată cu siglă acesteia, sub formă de indice. Spre exemplu, *Eco*_K indică prezența restrictazei la tulpina K a *E. coli*. Deoarece scrierea și culegerea indicilor prezintă inconveniente din punctul de vedere tipografic, în ultimii ani s-a extins scrierea tuturor abrevierilor în rînd (spre exemplu, *Eco* K).

În cazurile în care o anumită tulpină bacteriană produce mai multe tipuri de endonucleaze de restricție diferite (deosebirile sînt legate de natura secvenței pe care o recunosc și la nivelul căreia produc clivarea ADN), se marchează această particularitate prin adăugarea unor numere romane. Spre exemplu, denumirile *Hind* I, *Hind* II și *Hind* III se referă la trei endonucleaze de restricție diferite, produse de tulpina Rd de *Haemophilus influenzae*.

În sfîrșit, în cazurile în care informația genetică ce codifică sinteza enzimelor respective este purtată de un genofor diferit de cromosomul bacterian, denumirea enzimei poartă indicații în acest sens prin menționarea numelui abreviat al speciei (în cazul virusurilor) sau al elementului extracromosomal (în cazul plasmidelor). Astfel, denumirea *Eco* P1 arată că este codificată de genomul fagului P1, iar *Eco* RI că este codificată de o plasmidă R a *E. coli*. Deși propunerile inițiale ale lui Smith și Nathans indicau necesitatea menționării acțiunii de restricție (R) sau de modificare (M) în denumirea enzimei înainte de caracterizarea sistemului (*R-Hind* III sau *M-Hind* III), această propunere a fost abandonată atît pentru motive de simplificare, cit și pentru faptul că denumirile rămase sînt suficient de caracteristice pentru identificarea enzimelor respective.

Secvențele specifice de recunoaștere

În ultimii ani au fost stabilite secvențele specifice de recunoaștere pentru ~320 de enzime de restricție. Ele sînt, de regulă, tetra-, penta- sau hexanucleotide, cu structură de palindrom, avînd simetrie rotațională de tip 2. În foarte multe cazuri, situsul de recunoaștere este și situs de clivare. Pozițiile de clivare pot fi situate simetric sau asimetric în palindrom, în raport cu axul de simetrie. În cazurile în care cele două catene ale moleculei de ADN sînt secționare la același nivel, se produc fragmente

cu extremități tăiate drept. Dacă secțiunile efectuate de restricțaze sînt decalate pe fiecare catenă cu 3, 4 sau 5 baze, în raport cu axul de simetrie, vor fi produse fragmente de ADN, cu extremități monocatenare adezive sau „lipicioase”.

Enzimele de restricție pot produce trei tipuri diferite de fragmente de ADN în raport cu situsul de clivare și cu particularitățile structurale ale extremității fragmentelor rezultate din acțiunea lor:

1) Enzimele de restricție produse de *Haemophilus influenzae* d II (*Hind* II) și *Haemophilus parainfluenzae* (*Hpa* I) secționează ambele catene ale ADN dublu catenar în același loc, în mijlocul secvenței de recunoaștere, la nivelul axului de simetrie rotațională al palindromului, producînd fragmente de ADN cu extremitățile tăiate drept („blunt”, „flush”- sau „direct-ends”) (tabelul nr. 49). În aceste cazuri, legarea extremităților similare regenerează situsul de recunoaștere pentru restricțaza respectivă și, ulterior, fragmentul poate fi reizolat — dacă este nevoie — prin clivare din nou cu aceeași restricțază specifică.

Tabelul nr. 49

Caracteristicile principalelor endonucleaze de restricție producătoare de fragmente de ADN cu extremitățile secționate drept *

Denumirea enzimei	Bacteria producătoare	Secvența specifică de recunoaștere și acțiune	Numărul de situsuri de clivare **				
			Fagul ΦX174	Fagul lambda	SV40	Ad2	pBR 322
<i>Pvu</i> I	<i>Proteus vulgaris</i>	5'..CGA ↓ TCG..3'	0	3	0	7	1
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	CCC ↓ GGG	0	3	0	12	0
	Sb						
<i>Pvu</i> II	<i>Proteus vulgaris</i>	CAG ↓ CTG	0	15	3	22	1
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	GTT ↓ AAC	3	13	4	6	0
<i>Hind</i> II	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	GTPi ↓ Pu [*] AC	13	34	7	>20	2
<i>Bal</i> I	<i>Brevibacterium albidum</i>	TGG ↓ CCA	0	15	0	17	1
<i>Hae</i> I	<i>Haemophilus aegyptius</i>	(^A TGG ↓ CC ^T _A)	6	?	11	?	1
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG ↓ [*] CC	11	>50	19	>50	22
<i>Bsu</i> RI	<i>Bacillus subtilis</i> X5	GG ↓ CC	11	>50	19	>50	22
<i>Alu</i> I	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG ↓ CT	24	>50	35	>50	16

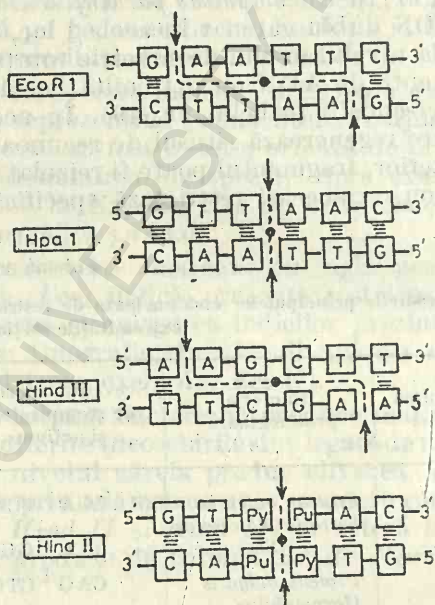
* Pentru simplificare, secvențele de recunoaștere au fost scrise numai pentru o catenă, în direcția 5'→3'. Punctele de clivare au fost marcate cu săgeți (↓), iar cele de modificare cu un asterisc: ^{*}A — N⁶-metiladenină; ^{*}C — 5-metilcitozină; Pu — A sau G; Pi — T sau C.

** Datele se referă la fagul ΦX174 (~1,7×10⁶ dal), fagul lambda (~33×10⁶ dal), virusul SV40 (~3×10⁶ dal), adenovirus tip 2 (~25×10⁶ dal) și plasmida pBR 322 (~2,3×10⁶ dal).

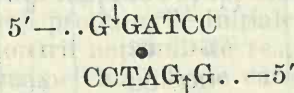
2) Alte enzime, ca, de exemplu, cele produse de *E. coli* RI (*Eco* RI) sau de *H. influenzae* d III (*Hind* III), „taie” cele două catene decalat („staggered”), de o parte sau alta a axului de simetrie al secvenței de

recunoaștere (fig. 323). În acest caz, fiecare fragment de ADN rezultat din clivarea ADN va avea o prelungire, ca o „coadă” monocatenară, cu secvențe nucleotidice complementare analoge înrândurilor extremităților adezive („lipicioase”) sau coezive („cohesive ends” sau „sticky ends”) descrise la fagul lambda (tabelul nr. 50). Aceste fragmente se pot asocia prin legături de H, între extremitățile 5', permițând fie reacții intramoleculare, cum se întâmplă în cazul genomului λ , în cursul infecției litice a celulei bacteriene *, fie asocieri intermoleculare.

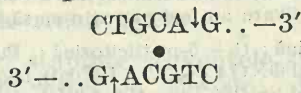
Fig. 323. — Secvențele de baze recunoscute de unele enzime de restricție. Săgețile indică situsul de incizie a ADN. Enzimele provenite de la *E. coli* R 1 și *Haemophilus influenzae* d III clivează decalat, determinând formarea de „extremități coezive”, iar cele de la *H. influenzae* d II și *H. parainfluenzae* secționază ambele catene la același nivel. Secvențele de baze sînt palindromice în raport cu axul de simetrie (•) (după Watson, 1977).



În cazul enzimelor care „taie” la stînga axului de simetrie al secvenței specifice de recunoaștere, extremitățile vor avea capete 5' terminale, ca de exemplu în cazul enzimei *Bam* HI, produsă de *Bacillus amyloliquefaciens* H :



Dacă enzimele secționază la dreapta centrului secvenței specifice de recunoaștere, ca în cazul enzimei *Pst* I produsă de *Providencia stuartii* 164, extremitățile vor avea capete 3' terminale :



În principiu, fragmentele de ADN produse cu ajutorul aceleiași enzime, care determină formarea de extremități coezive identice, pot fi

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, p. 236.

Tabelul nr. 50

Caracteristicile principalelor endonucleaze de restricție producătoare de fragmente de ADN cu extremități adezive*

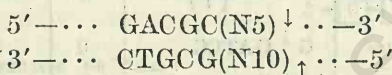
Denumirea enzimei	Bacteria producătoare	Secvența specifică de recunoaștere și acțiune	Numărul de situsuri de clivare **				
			Fagul ΦX174	Fagul lambda	SV40	Ad2	pBR 322
<i>Eco RI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY 13	5'..G↓AATC..3'	0	5	1	5	1
<i>Eco RII</i>	<i>Escherichia coli</i> R 245	CC*($\begin{smallmatrix} A \\ T \end{smallmatrix}$)GG	2	>35	16	>35	6
<i>Bam HI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> II	G↓GATCC	0	5	1	3	1
<i>Bgl II</i>	<i>Bacillus globigii</i>	A↓GATCT	0	6	0	12	0
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A↓AGCTT	0	6	6	11	1
<i>Pst I</i>	<i>Providencia stuartii</i> 104	CTGCA↓G	1	18	2	25	1
<i>Sac I</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>	CAGCT↓C	0	2	0	7	0
<i>Xma I</i>	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	C↓CCGGG	0	3	0	12	0
<i>Sal I</i>	<i>Streptomyces albus</i>	G↓TCGAG	0	2	0	3	1
<i>Xho I</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>	C↓TCGAG	1	1	0	6	0
<i>Ava I</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	C↓PICGPaG	1	8	0	15	1
<i>Hae II</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	PuGCGC↓Pi	8	>30	1	>30	11
<i>Kpn I</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	GGTAC↓C	0	2	1	8	0
<i>Sst II</i>	<i>Streptomyces stanfordi</i>	CCGC↓GG	1	4	0	>25	0
<i>Hinf I</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> RI	G↓ANTC	21	>50	10	>50	10
<i>Ava II</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	G↓G($\begin{smallmatrix} A \\ T \end{smallmatrix}$)CC	1	>17	6	>30	8
<i>Asu I</i>	<i>Anabaena subcylindrica</i>	G↓GNCC	2	>30	11	>30	15
<i>Taq I</i>	<i>Thermus aquaticus</i> YTI	T↓CGA	10	>50	1	>50	7
<i>Hpa II</i>	<i>Haemophilus para-influenzae</i>	C↓CGG	5	>50	1	>50	26
<i>Hap II</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	C↓CGG	5	>50	1	>50	26
<i>Mno I</i>	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	C↓CGG	5	>50	1	>50	26
<i>Hha I</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'..GCG↓C..3'	18	>50	2	>50	31
<i>Mbo I</i>	<i>Moraxella bovis</i>	↓GATC	0	>50	8	>50	22

* Pentru simplificare, secvențele de recunoaștere au fost scrise numai pentru o catenă, în direcția 5'→3'.Punctele de clivare au fost marcate cu săgeți (↓),iar cele de modificare cu un asterisc: A = N⁶-metiladenină, C = 5-metilcitozină ; N = orice nucleotid, cu condiția ca pe catena opusă să fie un nucleotid complementar; Pi = C sau T; Pu = A sau G.

** Datele se referă la fagul ΦX174 (~1,7×10⁶ dal), fagul lambda (~33×10⁶ dal), virusul SV40 (~3×10⁶ dal), adenovirus tip 2(~25×10⁶dal) și plasmida pBR 322 (~2,3×10⁶ dal).

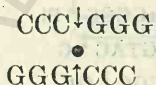
reunite, indiferent de proveniența lor, datorită asocierilor intermoleculare bazate pe complementaritatea secvențelor respective. Ulterior, breșele rămase deschise, după reunire, în cele două catene pot fi închise cu ajutorul ligazelor pentru a forma molecule de ADN recombinant artificiale.

3) Spre deosebire de enzimele cu acțiune simetrică ce produc fragmente de ADN cu extremități identice, complementare, unele enzime „taie” asimetric, la distanțe întâmplătoare. Ca urmare, spre exemplu, toate fragmentele produse de restrictaza *Hga I*, produsă de *Haemophilus gallinarum*, au extremități monocatenare formate din cinci baze, cu secvențe nespecifice. Această enzimă secționează molecula de ADN d.c. după schema :

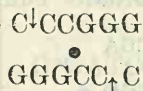


Endonucleazele izoschizomere. Au fost descrise o serie de enzime produse de *B. subtilis*, *Haemophilus aegyptius*, *H. haemoglobinophilus* etc., care manifestă specificitate pentru același situs de recunoaștere. Endonucleazele care recunosc aceeași secvență specifică au fost denumite de Roberts (1976) izoschizomere. Un exemplu caracteristic este furnizat și de endonucleazele *Xma I*, produsă de *Xanthomonas malvacearum*, și *Sma I*, produsă de *Serratia marcescens*, care recunosc același palindrom : CCC G G G .

Endonucleaza *Sma I* clivează la același nivel, exact în axul de simetrie al palindromului, determinând formarea a două fragmente de ADN „tăiate” drept :



Endonucleaza *Xma I* recunoaște aceeași secvență dar o clivează decalat, la distanță de două nucleotide, în raport cu axul de simetrie, producând formarea de extremități adezive :



Marea majoritate a endonucleazelor de restricție izolate până în prezent clivează numai moleculele de ADN dublu catenar nemodificat. Au fost descrise însă și unele excepții de la această regulă. Astfel, restrictazele *Hae III*, *Hha I*, *Sfa I*, *Hpa II*, care recunosc palindroame tetranucleotidice formate numai din C și G, clivează ADN fagice m.c. ΦX174 și *fd*. În sfârșit, restrictaza *Dpn I*, sintetizată de *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*, clivează ADN modificat (metilat) și niciodată pe cel nemodificat.

Clasificarea sistemelor de restricție și modificare

Au fost descrise patru tipuri de sisteme enzimactice diferite, de restricție și modificare (Collins și Mayer, 1980), în funcție de natura infor-

mației genetice care le codifică și de mecanismul lor molecular de acțiune, respectiv de structura enzimelor și de situsul lor de recunoaștere și de clivare.

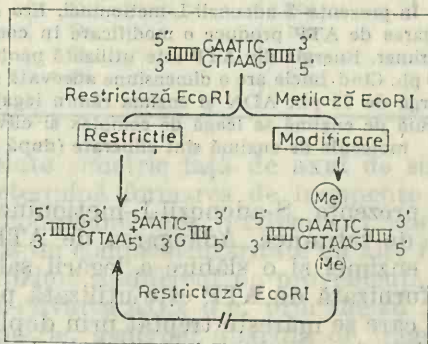
Endonucleazele de tip I. Restrictazele de tip I au fost izolate aproape simultan de Meselson și Yuan (1968), precum și de Linn și Arber (1968), de la *E. coli*, tulpinile K și B. Ele recunosc anumite secvențe nucleotidice specifice, dar nu au activitate endonucleazică la situs specific și de aceea nu produc diferitele fragmente în cantități echimoleculare.

Linn și colab. (1974) au arătat că endonucleazele de restricție *Eco K* și *Eco B*, izolate de la tulpinile K și B ale *E. coli*, sînt proteine complexe multimerice, cu greutatea moleculară relativ mare (~420 000 dal), și sînt formate din subunități diferite. Astfel, restrictaza *Eco K* este formată din cinci subunități — două subunități α (~135 Kdal), produse ale genei *hsd R* („host specific degradation”), care specifică funcția endonucleazei de restricție (R); două subunități β (~62 Kdal), produse ale genei *hsd M*, polipeptide necesare atît pentru funcția de restricție, cit și pentru cea de modificare, și o subunitate γ (~35 Kdal), produs al genei *hsd S*, care asigură legarea de situsul de recunoaștere și determină specificitatea întregului sistem (Kornberg, 1980). Cele trei gene sînt localizate adiacent pe harta cromosomului *E. coli*, în regiunea care se transferă după ~98 minute de la inițierea conjugării unei tulpini de *E. coli* K12, avînd ca punct zero arbitrar locusul *thr*.

În funcție de prezența sau de absența funcțiilor respective, au fost descrise bacterii R^+M^+ (cu un sistem de restricție — modificare funcțional), R^-M^- (cu acest sistem absent) și bacterii R^-M^+ (lipsite de activitate de restricție, dar capabile de modificare). Existența unor bacterii R^+M^- nu a fost observată.

Activitatea endonucleazelor de tip I este condiționată de prezența unor cofactori ca *S-adenozilmetionina*, ATP și Mg^{2+} . *S-adenozilmetionina* este necesară pentru activarea enzimei în vederea recunoașterii secvenței specifice a ADN. ATP este necesar pentru activarea enzimelor, ca și pentru clivarea ADN. Endonucleazele de tip I funcționează în același timp ca enzime de restricție și de modificare. S-a demonstrat că prezența

Fig. 324. — Modul de acțiune a sistemului de restricție și modificare *Eco RI* (după Szalay, Mackay și Langridge, 1979).



unei grupări metil ($-CH_3$) pe una din catenele ADN d.c. este suficientă pentru a suprima funcția de clivare și dirijează enzima pentru a metila cea de-a doua catenă (fig. 324). În cazul clivării de restricție a ADN,

Eco B rămâne legată în această configurație de ADN, o a doua moleculă de *Eco B* se leagă de cea de-a doua catenă intactă, inducând producerea unei degradări similare în cea de-a doua catenă. Rezultatul final este secționarea moleculei de ADN d.c. la o distanță variabilă ($\sim 1\,000$ – $6\,000$ de nucleotide) de secvența de recunoaștere originară.

Deoarece clivarea este localizată la întimplare, procesul este considerat ca nespecific, iar fragmentele produse sînt foarte eterogene ca mărime. Din această cauză, fragmentele de ADN produse de endonucleazele de tip I nu pot fi folosite în experiențele de clonare și nici în cele de analiză structurală a ADN.

Endonucleazele de tip II. Smith și Wilcox (1970), precum și Kelly și Smith (1970) au izolat și caracterizat restricțiile produse de *Haemophilus influenzae*, iar Danna și Nathans (1971), care le-au utilizat pentru clivarea moleculelor de ADN SV40 circular închis covalent, au demonstrat capacitatea lor de a produce — în cantități echimoleculare — fragmente omogene, bine definite, datorită clivării riguroase la situsuri specifice.

Endonucleazele de tip II sînt proteine relativ simple (dimeri sau tetrameri ai unui singur lanț polipeptidic). Au g.m. $\sim 20\,000$ – $100\,000$ dal, sînt relativ stabile și necesită pentru activitate numai prezența de Mg^{2+} (tabelul nr. 51).

Tabelul nr. 51

Caracteristicile de detaliu ale celor două tipuri principale de endonucleaze de restricție

Caracteristicile	Tipul I	Tipul II
Exemple	<i>Eco K</i> , <i>Eco B</i>	<i>ECO RI</i> , <i>Hind II</i>
Recunoașterea ADN	La situs specific	La situs specific
Clivarea	La întimplare	La situs specific
Natura produselor clivării	Eterogenă	Fragmente specifice
Producerea de extremități 5'	Alterată	Normală
Nevoia de ATP	Da	Nu
Nevoia de S-adenozilmetionină	Da	Nu
ATPază	Da	Nu
Nevoia de Mg^{2+}	Da	Da
Funcția de modificare	Da	Nu

Unele produc incizii decalate simetric față de axul de simetrie al secvenței de recunoaștere și determină formarea de fragmente de ADN cu extremități monocatenare complementare (extremități adezive sau coezive). Ele se pot lega pe bază de complementaritate cu alte fragmente de ADN secționate cu aceeași enzimă, indiferent de proveniența lor. Alte endonucleaze de tip II produc clivarea ADN d.c. prin incizii la același nivel în raport cu axul de simetrie, generînd apariția de fragmente cu extremități „drepte” secționate la același nivel („flush ends”).

Numărul situsurilor de clivare și deci al fragmentelor produse este, în general, variabil, în funcție de mărimea secvențelor de recunoaștere și a

genomului asupra căruia acționează enzima. Teoretic, presupunind că toate bazele au o frecvență egală în structura moleculei de ADN, o anumită secvență de 4 nucleotide poate fi întâlnită o dată la 4^4 (256) nucleotide. Pe aceleași criterii, o secvență de recunoaștere, cu o lungime de șase nucleotide va fi întâlnită o dată la fiecare 4^6 (4 096) nucleotide. Datorită acestor particularități, folosind o „baterie” de endonucleaze, un cromosom de tip eucariot ($\sim 10^8$ dal) poate fi clivat în fragmente specifice, cu dimensiuni corespunzătoare pentru cartare, clonare sau pentru analiza secvenței nucleotidelor. În aceste condiții, este evident că moleculele de ADN „străine” suficient de mari, indiferent dacă poartă informație genetică utilă sau dăunătoare pentru o celulă bacteriană, au o mare șansă să poarte unul sau mai multe situsuri de recunoaștere pentru endonucleazele de restricție, care, prin producerea unor breșe monocatenare („nicks”) sau prin clivarea ADN d.c., pot declanșa distrugerea lor de către alte nucleaze celulare.

Spre deosebire de endonucleazele de tip I, restrictazele de tip II nu au funcții de modificare. Rolul de metilaze este îndeplinit de proteine specifice diferite, prezente în unele cazuri ca monomere. Astfel, restrictaza *Mbo I*, produsă de *Moraxella bovis*, recunoaște o secvență de patru nucleotide inclusă într-o altă secvență de șase nucleotide recunoscută de enzima *Bam III* de la *Bacillus liquefaciens*. În sfârșit, unele restrictaze, ca, de exemplu, *Hind I*, recunosc secvențe nucleotidice cu un grad relativ însemnat de ambiguitate.

Endonucleazele de tip III au ca reprezentanți tipici enzimele *Bgl*, produse de *Bacillus globigii*, și *Hph*, produsă de *Haemophilus parahaemolyticus*. Ele au o serie de proprietăți împrumutate de la tipurile I și II.

Situsul lor de recunoaștere este specific și uneori asimetric. Ele clivează ADN d.c. în interiorul situsului de recunoaștere sau, cel mai adesea, la o distanță specifică de acest situs. Datorită acestui mecanism, formează fragmente de ADN cu extremități monocatenare adezive a căror secvență nu este specifică pentru enzima respectivă, ci are specificitate pentru fiecare situs de clivare în parte. Datorită acestor particularități, fragmentele de ADN produse de endonucleazele de tip III nu pot fi reasamblate decît pentru a reface ordinea originară.

Endonucleazele de tip IV formează un grup speculativ deschis, în care Collins și Mayer (1980) includ enzimele ce participă în fenomenele de recombinare la situs specific. În cazul acestora, situsul de recunoaștere poate avea grade diferite de complexitate. Lista include endonucleazele cu rol în integrarea și exicizia fagului λ (funcțiile *int* și *xis*, care acționează pe regiunea *att*), a secvențelor de inserție (SI) și a transpozonilor (Tn), ca și a secvențelor „flip-flop”, în cazul fagului Mu sau în reglarea tipului flagelar la *Salmonella*.

„Familiile” de endonucleaze. Una din trăsăturile particulare ale endonucleazelor de restricție, care s-a dovedit deosebit de utilă în practică, este prezența de „familii” de enzime, ce produc clivarea ADN în fragmente care au extremități coezive identice (fig. 326) (Collins și Mayer, 1980). „Familiile” de restrictaze au o importanță practică pentru cerc-

tările de inginerie a genelor, deoarece se pot înlocui unele pe altele în experiențele de clonare.

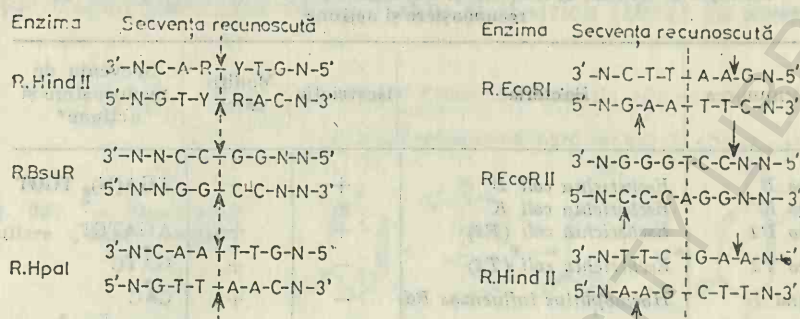


Fig. 326. — „Tintele” de acțiune ale unor enzime de restricție. Grupul de enzime din stînga produce incizii la nivelul axului de simetrie rotațională al secvenței de recunoaștere, iar cel din dreapta, incizii decalate față de acesta. Lungimea extremităților coezive este variabilă în funcție de mărimea secvenței. Linia întreruptă indică axul de simetrie rotațională binară. N indică oricare nucleotid, cu condiția menținerii complementarității pe catene opuse; R — purină; Y — pirimidină (după Murray, 1976).

Interacțiunile dintre endonucleazele de restricție și substratul lor, moleculele de ADN d.c., au fost studiate în detaliu cu ajutorul unor secvențe scurte oligonucleotidice, care conțin în structura lor situsul de recunoaștere al enzimei. S-a demonstrat, spre exemplu, în cazul enzimei *Eco RI* că secvența sintetică TGAATTC reprezintă substratul de acțiune atît pentru endonuclează, cît și pentru metilaza *Eco RI*. Descoperirea și utilizarea acestor polinucleotide sintetice s-a dovedit foarte utilă nu numai pentru descifrarea situsului de legare și a modului de interacțiune dintre enzime și ADN. Datorită lor a devenit posibilă producerea comercială a unor scurte polinucleotide sintetice, conținînd, spre exemplu, situsurile de clivare ale enzimelor *Eco RI*, *Hind III*, *Bam HI*, *Hpa II*, *Hae III* și *Alu I* etc., care pot fi folosite pentru adîția de extremități adezive unor fragmente de ADN tăiate drept („flush ended”), facilitînd astfel legarea și clonarea lor (Greene și colab., 1975; Bahl și colab., 1977).

Mecanismele moleculare ale modificării

Modificarea este procesul prin care unele enzime specifice sintetizate de bacterii acționează pentru a modifica natura bazelor la nivelul secvențelor specifice ale ADN, recunoscute de endonucleazele de restricție făcîndu-le rezistente la acțiunea acestora. Au fost descrise două mecanisme moleculare de modificare.

Modificarea prin metilare

Mecanismul molecular cel mai răspîndit este cel de metilare la situsuri specifice, care se realizează sub acțiunea metilazelor de modificare (tabelul nr. 52).

Tabelul nr. 52

Exemple de sisteme de restricție și modificare și secvența situsurilor lor de recunoaștere și acțiune

Denumirea	Bacteria	Restricția	Modifi- carea	Secvența de recunoaștere și acțiune*
<i>Eco B</i>	<i>Escherichia coli B</i>	+	+	TGA(N) ₈ TGCT
<i>Eco K</i>	<i>Escherichia coli K</i>	+	+	?
<i>Eco P1</i>	<i>Escherichia coli (P1)</i>	+	+	AGATCT
<i>Eco T2</i>	<i>Escherichia coli (T2)</i>	—	+	GATC
<i>Hind I</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	—	+	CAC
<i>Hind II</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	+	+	GTPi ↓ Pu*AC
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	+	+	A ↓ AGCTT
<i>Hind IV</i>	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	—	+	GAC
<i>Eco RI</i>	<i>Escherichia coli RY 13</i>	+	+	G ↓ AATTC
<i>Eco RII</i>	<i>Escherichia coli R 245</i>	+	+	CC ^(A) _(T) GG
<i>Bbr SI</i>	<i>Bacillus brevis S</i>	—	+	GC ^(A) _(T) GC
<i>Mbo I</i>	<i>Moraxella bovis</i>	+	+	↓ GATC

* Pentru simplificare, a fost menționată secvența pe o singură catenă scrisă în direcția 5'→3'; săgețile indică poziția clivării în lanțul polinucleotidic; situsul modificat prin metilare este marcat cu un asterisc; PU = G sau A, Pi = C sau T; N-nucleotid nespecificat.

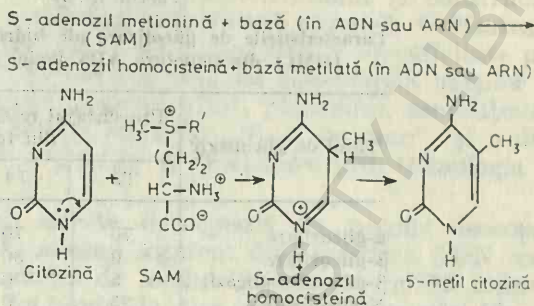
În celulele procariote, ADN conține ~1 mol% baze metilate, în special sub formă de 6-metiladenină (Kornberg, 1980). Eucariotele unicelulare conțin fie 6-metiladenină (*Tetrahymena*), fie 5-metilcitozină (levurile), fie ambele baze metilate (*Chlamydomonas*). De obicei, modificarea prin metilare se realizează pe ambele catene ale moleculei de ADN, în cursul replicării acesteia. S-a demonstrat însă, că și modificarea unei singure catene este suficientă pentru a împiedica acțiunea restrictazelor. Nucleotidele metilate nu sînt încorporate direct, ci prin transferul grupării metil sub acțiunea ADN-metilazelor specifice de la S-adenozilmetionină, care servește ca donator de metil la adenina sau citozina situată la nivelul anumitor situsuri specifice în genom (Hattman și colab., 1978).

Procesul care necesită prezența unui metal bivalent (Mg^{2+}) are drept rezultat producerea de N-6-metiladenină sau respectiv 5-metilcitozină (fig. 327). La *E. coli*, acționează în special enzima de modificare adenin-metilaza produs al genei *dam*, care recunoaște tetranucleotidul simetric d (pGATC) din structura ADN d.c. și introduce grupări metil în două molecule de adenină la fiecare situs.

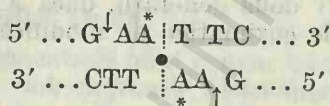
Metilarea ADN *in vivo* este cuplată cu replicarea acestuia și este efectuată în 2 min după terminarea sintezei, în așa fel încît fragmentele moleculei de ADN născînde, rezultate din replicare, sînt aproape complet

metilate. Procesul este favorizat de faptul că situsurile specifice recunoscute de enzima *dam* (metilaza) sînt situate preferențial aproape de extremitățile fragmentelor respective. Rubin și Modrich (1977) au descris *Eco*

Fig. 327. — Reacția de metilare a acizilor nucleici.



RI metilaza. Ea recunoaște o secvență hexanucleotidică, cu simetrie binară, după care transferă grupările metil la resturile de adenină adiacente axului de simetrie, după schema :



Metilarea la nivelul situsurilor de recunoaștere și de acțiune ale restrictazelor sau foarte aproape de ele realizează o adevărată „camuflare” a ADN străin, fapt care asigură menținerea lui în celula-gazdă. În cazul ADN fagic, acest proces permite replicarea fagului și liza bacteriei-gazdă. Același mecanism protejează ADN propriu cromosomal bacterian, care „scapă” astfel de acțiunea distrugătoare a nucleazelor de restricție proprii.

Modificarea prin glicozilare

Prima observație referitoare la rolul protector al modificării ADN controlate de gazdă a fost făcută asupra fagilor care se adaptează și se replică cel mai bine într-o tulpină de *E. coli*, numai după ce au fost cultivați pe tulpina respectivă. Ulterior s-a demonstrat că în celulele de *E. coli* această comportare este rezultatul glicozilării ADN fagic. Modificarea prin glicozilare este caracteristică pentru fagii din seria T par (T2, T4, T6), care conțin în structura lor o bază pirimidinică specială, 5-hidroximetilcitozină, în loc de citozină (Cohen, 1966).

În cursul procesului de modificare, resturile de hidroximetilcitozină sînt total sau parțial glicolizate. Gradul și tipul de glicolizare (α sau β) sînt determinate, probabil, de natura fagului (tabelul nr. 53).

Glicolizarea se realizează prin transferul glucozei de la glucouridindifosfat, furnizat de celula-gazdă la ADN fagic nou replicat, sub acțiunea enzimelor α - și β -glicozil transferaza. Cele două enzime sînt produsul genelor α *gt* și β *gt*, situate în genomul fagului T4 în pozițiile corespunz-

toare distanței de 39, și respectiv 23 Kb pe harta circulară a acestuia (Revel și Luria, 1970), Kornberg, 1980). Prezența moleculelor de hidroximetilcitozină neglicolizate în structura anumitor secvențe ale ADN, este

Tabelul nr. 53

Caracteristicile de glicolizare ale hidroximetilcitozinei (HMC) din structura ADN fagice, seria T-par

Tipul de glicolizare	Procentajul resturilor de HMC din total		
	T2	T4	T6
α -glicozilare	70	70	3
β -glicozilare	0	30	0
β -glicozil- α -glicozil	5	0	72
Neglicolizare	25	0	25

recunoscută de endonucleazele de restricție care determină clivarea acestuia. Modificarea ADN este un caracter genetic instabil. El este pierdut în decursul a aproximativ două generații, dacă ADN este replicat într-o gazdă lipsită de sistemele enzimatice de modificare.

Bazele genetice ale fenomenului de restricție și modificare

Informația genetică necesară pentru codificarea sintezei enzimelor sistemului de restricție-modificare poate fi localizată fie în cromosomul bacterian, fie în genomul fagului sau al plasmidelor. Aceasta demonstrează că unele plasmide (R sau Col) conțin informație genetică menită să pună în acțiune mecanisme moleculare de excludere a altor tipuri de ADN străin (Burns, 1976). Când genele sistemului de restricție—modificare sînt localizate în structura plasmidelor sau a fagilor lizogeni, ele operează independent de sistemul propriu gazdei, codificat de gene cromosomale.

În cazurile în care două sisteme de restricție și modificare sînt prezente în aceeași bacterie, în general, restricția ADN străin este mult mai eficientă. ADN fagice, care eventual „supraviețuiește” în astfel de celule, dispune de capacitatea de modificare capabilă să contracareze acțiunea ambelor sisteme de restricție.

Importanța descoperirii sistemelor de restricție și modificare pentru biologia moleculară și aplicațiile sale

Descoperirea sistemelor de restricție și izolarea endonucleazelor de restricție active la nivelul unui situs specific au revoluționat atât cercetarea fundamentală de biologie moleculară, cît și aplicațiile ei, deschizînd drumul

revoluției biotehnologice sau bioindustriale. Au devenit posibile studiul aprofundat fizic, chimic și genetic al informației din diferite molecule de ADN, excizarea și izolarea genelor, determinarea structurii lor, sinteza unor polidezoxinucleotide cu secvență predeterminată și construcția *in vitro* de gene active prin recombinație sau sinteză chimică. Utilizarea unor „colecții” de endonucleaze de restricție, având fiecare specificitate pentru o anumită secvență din ADN, a făcut posibilă construcția hărților fizice și genetice ale unor genomuri mici (virusuri, plasmide), secvențializarea parțială sau totală a ADN, alcătuirea unor „bănci de gene” și a deschis calea tehnicilor de inginerie a genelor și de clonare prin tehnologia ADN recombinant.

Pe plan fundamental, aceste descoperiri au permis descoperirea genelor „suprapuse”, în care același segment din structura ADN codifică două proteine diferite, în funcție de modul în care este citită informația genetică, explicând în acest fel modul în care unele virusuri mici (de exemplu, fagul ΦX174) fac economie de informație genetică.

În plus, au permis descoperirea genelor cu structură „discontinuuă, alcătuite din introni și exoni și a fenomenului de „înnădire” („splicing”) a ARNm.

Cartarea genomurilor virale

Posibilitatea fragmentării unui genom total relativ mic și a separării fragmentelor obținute sub acțiunea restrictazelor, prin electroforeză în gel, a permis izolarea unor prime segmente genomice. Supuse acțiunii unei a doua sau chiar a treia enzime de restricție, ele au fost clivate în fragmente izolate mai mici. În felul acesta a fost elaborată o metodă de stabilire a ordinii fragmentelor adiacente, numită cartarea fragmentelor de ADN. Utilizând această metodă, Nathans și colab. (1973) a construit harta fizică a genomului SV40 complet și au reușit să stabilească ordinea fragmentelor produse de diferite endonucleaze de restricție, reconstruind aproape complet harta totală a genomului respectiv.

Fig. 328 prezintă diferitele fragmente obținute din molecula de ADN circular, reprezentând genomul SV40, a cărui hartă fizică este reprezentată de cercul interior, luând ca punct de origine situsul de clivare al enzimei *Eco RI*, produsă de tulpina *Rya E. coli*. Pe suprafața cercului intern sînt marcate, de asemenea, situsurile de clivare ale enzimelor *Bam I* (produsă de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Hpa II* (produsă de *Haemophilus parainfluenzae*) și *Hae II* (produsă de *H. aegyptius*). Fiecare din cercurile concentrice următoare reprezintă situsurile de clivare ale altor enzime de restricție. Spre exemplu, cercul al doilea (adiacent celui central) evidențiază rezultatul acțiunii enzimei *Hha I* (produsă de *H. haemolyticus*), care clivează ADN SV40 în două situsuri, eliberînd două fragmente A și B. Cercul următor (spre exterior) evidențiază acțiunea enzimei *Nco I* (produsă de *Nocardia corallina*), care eliberează trei fragmente, notate A, B și C, ș.a.m.d. În sfîrșit, cercul cel mai exterior arată rezultatul acțiunii enzimei *Alu* (produsă de *Arthrobacter luteus*), care produce un număr mare de clivări și eliberează un număr mare de fragmente (Berg și colab., 1977; Fiers și colab., 1978; Collins și Mayer, 1980). Stabilirea hărții complete genetice și fizice a ADN SV40 a permis înțelegerea ordinii în care are loc

transcrierea sa la moleculele de ARNm precoce și tardiv, traducerea acestora și producerea antigenului T și a proteinelor structurale, ca și localizarea genelor VP1, VP2 și VP3.

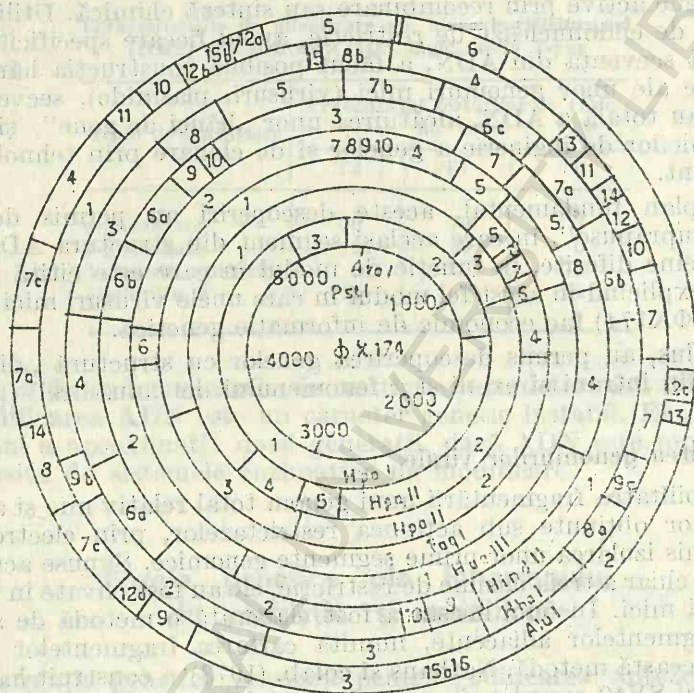


Fig. 328. — Harta genetică a fagului $\Phi X174$, obținută prin acțiunea restrictazelor (după Bethesda Research Laboratories Inc., 1985)

Aplicând aceleași tehnici, au fost stabilite hărțile genetice și fizice ale fagului $\Phi X174$ (Lee și Sinsheimer, 1974) și, ulterior, a unei largi categorii de molecule de ADN, incluzând fagii lambda, fd, M13 etc., ADN de adenovirus, poliomavirus, herpesvirus, ca și unele molecule de ADN mitocondrial din levuri și din celulele tumorale HeLa.

Analiza secvențelor ADN. Existența unui număr mare de enzime de restricție și cunoașterea hărților genetice și fizice a diferitelor molecule de ADN naturale au făcut posibilă secvențializarea lor, după clivarea la nivelul unor secvențe specifice, care apar numai de câteva ori de-a lungul unei molecule de ADN. În acest proces, restrictazele sunt folosite în același mod ca și tripsina pentru a cliva polipeptidele în fragmente mai mici. Astfel, restrictaza din *H. influenzae* clivează genomul SV40 în 11 fragmente, cea din *H. parainfluenzae* în 4, iar *Eco RI* numai în două (deoarece produce o singură clivare). Utilizarea unui set de restrictaze diferite permite clivarea genomului viral în fragmente mici de ~100 de nucleotide, a căror secvență este relativ ușor de stabilit. În felul acesta, analiza produșilor

de digestie parțială ai moleculelor de ADN și a secvențelor care se suprapun („overlapping”) a permis aranjarea tuturor fragmentelor într-o hartă circulară a genomului respectiv.

Posibilitatea determinării secvenței nucleotidelor în moleculele de ADN a stimulat elaborarea de tehnici rapide de secvențializare a unor segmente lungi de ~100 de nucleotide (Sanger și Coulson, 1975), apoi de ~200 de nucleotide (Maxham și Gilbert, 1977) și chiar de ~300—400 de nucleotide (Sanger, Nicklen și Coulson, 1977). Utilizînd tehnica „plus și minus”, Sanger și Coulson (1977) au stabilit secvența completă a celor 5 375 de nucleotide din genomul fagului Φ X174, precum și situsurile de înțiere și terminare a nouă proteine diferite. Utilizînd aceeași tehnică, Barrell și colab. (1976) au demonstrat pentru prima dată că aceeași secvență de ADN codifică două proteine Φ X specifice diferite — proteinele D și E — în funcție de cadrul de citire al informației genetice. A urmat stabilirea secvenței complete a unei plasmide ca pBR 322 *E. coli*, care are 4 361 de nucleotide (Sutcliffe, 1979), a genei care specifică β -lactamaza, a mai multor bacteriofagi, a unor transpozoni, ca și a unor gene din celulele animale ca de exemplu, genele pentru hormonul de creștere și proinsulina de la șobolan (Goodman, Seeburg și colab., 1977), pentru β -globulină etc. În felul acesta, combinarea tehnicilor de secvențializare rapidă cu acțiunea enzimelor de restricție a permis stabilirea secvenței parțiale sau totale a unor gene sau chiar a unor genomuri (Collins și Mayer, 1980).

Constituirea „băncilor” de gene. Izolarea ADN fagice, plasmidial, bacterian sau a celui extracromosomal din celulele eucariote (ADN mitochondrial sau din cloroplaste) se realizează în prezent ușor și în cantități care permit studiul lor amănunțit. Mult mai dificilă este identificarea, excizia izolarea genelor, atât din genomurile procariote, cît și din cele eucariote. Pentru a depăși aceste dificultăți au fost imaginate două metode (Collins și Mayer, 1980).

Prima metodă folosește celulele de *E. coli* K12 ca gazdă pentru identificarea diferitelor funcții cromosomale. *E. coli* K12 prezintă două avantaje majore și anume, are o hartă genetică relativ detaliat cunoscută și și o serie de tulpini R^-M^- și R^-M^+ , lipsite de enzime de restricție. Tehnica se bazează pe capacitatea unui segment de ADN cromosomal de a complementa o mutație auxotrofă în celula receptoare și posibilitatea realizării de transformări genetice ale tulpinilor R^-M^- sau R^-M^+ , fără degradarea ADN „străin” exogen. În acest scop, ADN cromosomal străin este fragmentat cu ajutorul unei endonucleaze de restricție și inserat într-un mic „vehicul de clonare” reprezentat de o plasmidă mică sau de un genom fagic special construit. Molecula hibridă, care conține segmentul de ADN cromosomal ce trebuie analizat, este utilizată pentru a transforma mutantele auxotrofe de *E. coli*. Celulele transformate eficient sub acțiunea unui fragment cromosomal dat se dezvoltă pe mediile selective corespunzătoare. Cunoșcînd natura mutației în *E. coli* se poate determina ușor funcția fragmentului de ADN străin.

Utilizarea endonucleazelor de restricție permite fragmentarea întregului genom al unui organism și introducerea fiecărui fragment într-o celulă bacteriană și respectiv într-o singură colonie (și cultură) de *E. coli*.

Colecția de colonii care conțin ansamblul genelor separate și clonate formează o „*bancă*” de gene („gene bank”) sau o „*bibliotecă*” de gene („gene library”).

Utilizând această tehnică, Clark și Carbon (1975) au realizat banca de gene completă a genomului *E. coli*.

Cea de-a doua categorie de metode vizează identificarea unor gene de tipul genelor din celulele animale, care nu se găsesc în *E. coli* sau care nu au capacitatea de a complementa mutațiile prezente în această bacterie. Au fost elaborate două metode și anume *hibridarea coloniilor* („clony hybridization”), de către Grunstein și Hogness (1976), și *hibridarea plăjelor in situ* („in situ plaque hybridization”), de către Benton și Davis (1977). Pentru punerea lor la punct s-a utilizat ARN marcat corespunzător genei globină de la șoarece sau ARN ribosomal de la *Drosophila*, care a fost pus în contact cu ADN total, provenit dintr-un număr mare de colonii ce au fost în prealabil imobilizate pe un filtru de membrană Millipore. Coloniile care conțin secvențe de ADN complementare cu tipurile de ARN studiate pot fi selectate datorită hibridării cu ARN marcat. După selecție, colonia care poartă gena dorită, poate fi obținută în culturi, furnizând în acest mod gena respectivă în cantitățile necesare pentru studiile genetice sau biochimice.

Construcția de vehicule de clonare in vitro. Descoperirea endonucleazelor de restricție, considerate inițial ca o curiozitate a naturii a pus bazele unor tehnologii cu importanță esențială pentru progresul studiilor biologice, reunite sub denumirea de ingineria genelor. Ele oferă posibilitatea de a lega gene provenite de la diferite organisme, care, în mod normal, nu schimbă între ele informație genetică. Prin inserția de informație genetică utilă într-o moleculă de ADN capabilă de replicare autonomă (plasmidă, genom fagic sau viral), ca vehicul sau vector, se pot obține molecule de ADN hibride utilizabile pentru a realiza reprogramarea genetică a unor celule-receptor. A devenit astfel posibilă clonarea unor molecule hibride provenite din celulele procariote în alte celule procariote (procariote → procariote) sau eucariote (procariote → eucariote), precum și clonarea informației genetice de proveniență eucariotă în celule procariote (eucariote → procariote).

Semnificația biologică a sistemelor de restricție și modificare

Endonucleazele de restricție sînt larg răspindite în natură, reprezentînd un sistem universal prezent în lumea bacteriilor, neevidențiat însă pînă în prezent la nici un organism de tip eucariot (Arber, 1977).

O primă funcție a enzimelor de restricție este aceea de a distruge moleculele de ADN „străin”, care intră în celulele bacteriene. O toleranță excesivă față de menținerea intracelulară a ADN străin ar putea perturba echilibrul funcțional al acestora pe mai multe căi: 1) prin exprimarea unor gene nou dobîndite; 2) prin modificarea exprimării unor gene proprii și 3) prin deleția unor funcții importante, codificate de segmentul de ADN propriu, eliminat prin încorporarea de material genetic străin prin recom-

binare. Încorporarea de material genetic străin poate avea loc fie prin omologie (recombinare genetică generală), fie prin incorporare la situsuri specifice sau recombinare „nelegitimă” în cazul ADN heterolog. Acționînd direct asupra ADN străin (imediat după ce acesta a pătruns în celulă), sistemul de restricție asigură degradarea și distrugerea acestuia împiedînd alterările ciclului de viață a bacteriilor, care ar putea fi induse pe căile menționate. În felul acesta, endonucleazele de restricție îndeplinesc rolul unui sistem imunologic primitiv, care protejează celula bacteriană, reducînd în mod foarte eficient fluxul de material genetic între diferite tulpini. Prin acest mecanism, bacteriile care posedă enzime de restricție își mențin constantă informația genetică și, prin aceasta, „originalitatea” și integritatea ca specie.

În același timp, sistemul de restricție și modificare permite celulei bacteriene să recunoască propriul său ADN și să-l protejeze, adăugînd grupări metil la nivelul nucleotidelor care constituie situsul de recunoaștere al restrictazelor proprii, făcîndu-l rezistent la clivare. Prezența hidroximetilcitozinei (în locul citozinei) și a ADN glicozilat în genomul unor fagi sau a capacității de a codifica sinteza unor inhibitori specifici ai endonucleazelor gazdei demonstrează că mecanismele de restricție au avut un rol important în evoluția virusurilor respective și că rolul acestor enzime *in vivo* este similar celui demonstrat *in vitro* (Arber, 1974, 1977; Spoerel și colab., 1979).

Experimental s-a demonstrat că informația genetică se poate transmite mai ușor între tulpini care posedă sisteme de restricție—modificare omologe, decît între tulpini cu sisteme diferite. Astfel, după ce plasmida RI a pătruns într-o celulă de *E. coli*, aceasta nu mai poate primi ADN de la tulpina inițială, devenind izolată genetic în raport cu aceasta. Ca urmare se poate considera că existența și capacitatea de acțiune a enzimelor sistemului de restricție și modificare produc un spectru complex de compatibilitate între tulpinile bacteriene, în ceea ce privește capacitatea ADN provenit de la o specie de a evita degradarea în interiorul celeilalte. Este, de asemenea, posibil ca din cauza simetriei situsurilor de acțiune a restrictazelor, aceste regiuni specifice ale ADN să reprezinte adevărate puncte critice de reglare, de funcții promotor sau sediul unor fenomene de recombinare la situs specific (Chang și Cohen, 1977). Chiar dacă aceste recombinații se produc în natură cu o frecvență mică mărimea populațiilor bacteriene face ca aceste procese să aibă o importanță considerabilă în evoluția bacteriilor (Roberts, 1978).

Prezența enzimelor de restricție are un rol important în echilibrul ecologic al populațiilor bacteriene și fagice în natură unde acestea întîlnesc condiții de mediu foarte diferite pentru creștere și asociații eterogene. Se apreciază că, în general, o bacterie care posedă un sistem de restricție eficient are mai multe șanse de a supraviețui într-o nișă ecologică anumită. Acționînd ca o barieră moleculară biochimică, sistemul de restricție temperează schimbul de material genetic efectuat uneori cu un înalt grad de promiscuitate la bacterii, limitînd transferul interspecific și intergeneric de ADN prin conjugare, transformare genetică, transducție fagică etc. Pe plan mai general, numărul foarte mare de enzime de restricție cu acțiune specifică ar putea fi una din cauzele marii diversități a speciilor și tulpinilor

bacteriene în natură, în măsura în care, opunindu-se acceptării unor segmente de ADN străin, împiedică uniformizarea materialului genetic la bacterii (Yaniv, 1978). În felul acesta, fenomenul de restricție și modificare ar funcționa ca un mecanism general și util de protecție care ar permite bacteriilor să schimbe informația genetică în interiorul aceleiași specii, fără ca să îngăduie integrarea cu ușurință a unor segmente genetice străine, provenite de la alte specii mai îndepărtate.

Deși rolul sistemului de restricție apare ca avînd o importanță deosebită pentru viața bacteriilor, există numeroase observații care demonstrează că acestea se pot dispensa de funcția de restricție și modificare, cel puțin în condiții de laborator. Dovada o constituie existența unor tulpini mutante, de bacterii absolut normale, fără alte modificări fenotipice, în afară de lipsa enzimelor de restricție (R^-M^+) sau a ambelor tipuri de enzime (R^-M^-). Nu au fost izolate tulpini (R^+M^-), deoarece această situație ar corespunde unei condiții letale: prezența restricției active în absența „modificării” ar duce la distrugerea ADN celular. În contrast cu aceste observații, numeroase date pledează pentru o răspindire foarte largă a enzimelor de restricție și modificare, ceea ce sugerează că ele ar îndeplini o funcție esențială în condiții naturale. Un argument în sprijinul acestei ipoteze îl furnizează și faptul că, în general, evoluția tinde să elimine genele cu funcții accesorii, de care, la un moment dat, celulele se pot dispensa (Arber, 1977).

Bazele teoretice și practice ale ingineriei genelor

Tehnologia ADN recombinant

„Pînă în prezent, cea mai mare contribuție a cercetărilor în domeniul tehnologiei ADN recombinant a fost, fără îndoială, în însăși biologia moleculară.”

R. W. OLD și S. B. PRIMEROSE

Cunoașterea mecanismelor moleculare ale fenomenului de restricție a permis lui Berg, Jackson și Symons (1972) punerea la punct a unor tehnici de fuzionare *in vitro* a moleculelor de ADN și, decurgînd din aceasta, posibilitatea de a lega artificial — prin recombinare genetică *in vitro* — informația genetică provenită de la specii foarte îndepărtate, creînd, în mod deliberat, cromosomi hibrizi. În acest mod, a fost creat genomul hibrid SV40 — fag λ *deg*al, primul construit *in vitro* cu această tehnologie, moleculă defectivă pentru sistemul de replicare al fagului λ , care nu a putut fi amplificată (Berg, 1972).

Ulterior, Cohen, Chang și Boyer (1973) au reușit să recombine *in vitro* plasmida *p SC 101* (care poartă gena *Tet^R*, de rezistență la tetracilină), secționată cu restrictaza *Eco RI*, cu o altă plasmidă, izolată tot de la *E. coli* (care purta gena *Kan^R*, de rezistență la kanamicină). Moleculele hibride rezultate au fost „grefate” în celule de *E. coli*, care au devenit rezistente la tetracilină și la kanamicină. Plasmidele izolate din celulele „transformate genetic” conțineau, pe lângă întreaga moleculă de ADN *p SC 101*, și un segment (gena *Kan^R*) provenit de la cea de-a doua plasmidă, deși acesteia îi lipseau funcțiile proprii de replicare. Se demonstra, astfel, că plasmida *p SC 101* poate servi ca „vehicul de clonare” pentru transmiterea unui segment de ADN, care nu se poate replica autonom, de la o bacterie la alta.

Cohen și Chang (1974) au reunit prin recombinare *in vitro* plasmidele *p 1258* (care poartă gena de rezistență la penicilină) și *p SC 101* (*Tet^R*), provenite de la organisme aparținînd unor specii și chiar genuri diferite (*Staphylococcus aureus* și respectiv *E. coli*). După replicare în *E. coli*, a fost obținută o plasmidă cu caracteristici moleculare provenite de la ambele microorganisme, iar bacteria-gazdă era rezistentă la cele două antibiotice. Replicarea și exprimarea în *E. coli* a unor gene provenite de la o bacterie cu care în mod normal nu schimbă material genetic a fost prima demonstrație a posibilității de a crea o breșă în barierele care separă în mod normal speciile biologice.

Ulterior au fost clonate prin hibridare cu plasmida *p SC 101* și propagare la *E. coli* primele gene de tip eucariot, ca, de exemplu, genele pentru un precursor ribosomal de *Xenopus laevis* (broasca cu gheare) (Morrow și Cohen, 1974), precum și unele gene de la adenovirusul uman, legate de fagul λ (Tiollais, 1976). Chang și Cohen (1974) au denumit moleculele de ADN construite în acest fel „himere de ADN”, deoarece conceptual,

sînt similare himerelor din mitologie și reprezintă echivalenți moleculari ai „himerelor” vegetale produse prin altoire. Procedul de obținere a acestor molecule a fost numit ingineria plasmidelor („plasmid engineering”), pentru că folosește plasmidele ca vector sau vehicul pentru a introduce unele gene străine într-o celulă bacteriană, iar procedul de transmitere clonare moleculară („molecular cloning”), deoarece furnizează o modalitate de a propaga o clonă sau o linie de organisme genetice identice, care conțin toate molecule himere identice, construite *in vitro* (Cohen, 1975).

Conceptul de inginerie a genelor

Conceptul de inginerie a genelor („genetic engineering”) nu are în prezent o delimitare clară, unanim acceptată. Cadrul și limitele sale au o extindere diferită în accepția diferiților cercetători, pe criterii care, nu rareori, sînt subiective și arbitrare. Acest fenomen este reflectat atît în denumirile diferite utilizate, cît și în preferințele diferite ale specialiștilor pentru a desemna acest gen de preocupări: manipularea genelor, inserția genelor, ingineria plasmidelor, „coaserea” ADN („DNA stitching”), geniu genetic, tehnologia genelor etc. Prin analogie cu actul chirurgical, tehnicile care permit incizia unor molecule de ADN cu ajutorul unor enzime, cum sînt endonucleazele de restricție (bisturie biochimice), și „ligaturarea” fragmentelor de gene reasortate cu alte enzime (ADN ligaze) au fost grupate sub denumirea de chirurgie a genelor. Mulți cercetători susțin denumirea de inginerie a genelor în conformitate cu sensul actual al noțiunii de inginerie (aplicarea principiilor științifice în scopuri practice, ca proiectarea, construcția și funcționarea unor structuri, echipamente și sisteme, eficiente și economice).

Holliday (1977) a propus termenul de „heterogenetică” pentru a caracteriza „activitățile” ce urmăresc sinteza și studiul moleculelor de ADN replicabile, care conțin secvențe nucleotidice provenite de la organisme/neînrudite.

Old și Primerose (1980) acordă prioritate termenului de manipulare a genelor, preferat de unii autori, după Antohi și Gavrilă (1981), pentru că sugerează rezultatele surprinzătoare ale clonării genelor. Termenul de manipulare, ca și cel de „bricolaj” genetic sînt, în același timp, criticate pentru sensul lor echivoc, nedelimitat clar, cu rezonanță evident antropomorfă, pentru caracterul lor prea general și, uneori, peiorativ.

O definiție cu valoare operațională valabilă pentru etapa actuală limitează cadrul ingineriei genelor la tehnici, de regulă neconvenționale, care ocolesc ciclul sexual, prin care se obține o celulă sau un organism cu proprietăți ereditare noi, prin formarea și incorporarea de noi combinații de material genetic natural sau artificial, exogen, destinat să aducă un caracter nou, favorabil, neinclus originar în patrimoniul ereditar al organismului respectiv sau destinat să înlocuiască o porțiune defectuoasă a materialului genetic respectiv, ca, de exemplu, o genă anormală sau mutantă (terapeutică genică).

O denumire acceptată de cei mai mulți specialiști este aceea de *tehnologie de ADN recombinant* („DNA recombinant technology”) propusă de Grobstein (1977). Ea grupează toate tehnicile care permit sinteza chimică sau izolarea mai multor gene naturale de la un organism, urmată de inserția lor în informația genetică a unei alte celule (aparținând chiar unei specii foarte îndepărtate), într-o astfel de formă, încât noua gazdă va copia ADN străin, inserat în mod artificial, după ce fragmentul de material genetic străin este reprodus și propagat continuu (clonat) în organismul noii gazde. El determină o modificare a patrimoniului genetic al acesteia (în general o bacterie), pentru a efectua sinteze chimice diferite de cele pe care are tendința să le realizeze în mod natural.

Ingenieria genelor nu este o disciplină nouă și nici o entitate, ci un grup de tehnici variate, adaptabile în funcție de particularitățile genetice, biochimice și biologice ale obiectivului propus (Cape, 1980; Cohen, 1981). După Chakrabarty și Brown Jr. (1979), bacteriile reprogramate genetic prin aceste tehnologii pot fi considerate ca un nou tip de tulpini mutante ale celulelor parentale originare, deoarece aproximativ 99% din structura lor genetică este identică cu a acestora. Numai 0,1–1% reprezintă gene adiționale, care, de regulă, nu au fost introduse niciodată prin procese de transfer naturale. Din aceasta decurge posibilitatea lor de a prezenta capacități metabolice calitativ diferite, de a oferi beneficii calitativ noi (de exemplu, producerea de către bacterii a unor produși normali ai celulelor animale) și de a prezenta noi tipuri de riscuri.

Principii generale ale tehnicilor de inginerie a genelor

Tehnicile care urmăresc manipularea directă a ADN prin clonare moleculară (tehnologia ADN recombinant), având ca model transferul unor gene din celula animală în celulele bacteriene, se desfășoară în următoarele etape succesive: 1) izolarea genelor naturale sau sinteza chimică a unor molecule de ADN, care codifică proteinele dorite; 2) selecția unui „vehicul” sau vector adecvat, capabil să transporte genele respective și apt să se replice autonom în celula receptoare; 3) asigurarea condițiilor care permit exprimarea informației genetice străine în celula bacteriană; 4) inserția genelor străine în structura genetică a moleculei-vector și obținerea unei himere moleculare; 5) introducerea acesteia într-o celulă bacteriană și transformarea ei și 6) selectarea celulelor modificate genetic din populația mare de celule rezultate prin multiplicare.

Obținerea fragmentelor de ADN utilizate pentru clonare

Tehnicile actuale de inginerie a genelor permit manipularea unor secvențe relativ mici (în medie 1 000–20 000 bp). De aceea, reușita intervenției este condiționată de prezența integrală a genei dorite și a

unei cât mai mici cantități de ADN nesemnificativ, „parazit”, periferic. Obținerea fragmentelor de ADN utilizate în clonare se realizează practic pe patru căi:

1) Utilizarea ADN natural cu ajutorul enzimelor de restricție

Fragmentarea specifică a ADN se realizează cu ajutorul endonucleazelor de restricție, care au proprietatea de a cliva moleculele de ADN în interiorul situsului de recunoaștere sau la oarecare distanță de el. Se folosesc, în special, restrictaze din clasa a II-a, care secționează numai ADN d.c. prin clivarea a două legături fosfodiester, cite una în fiecare catenă, producând fie extremități tăiate drept, fie secțiuni decalate care produc prelungiri monocatenare (fig. 329).

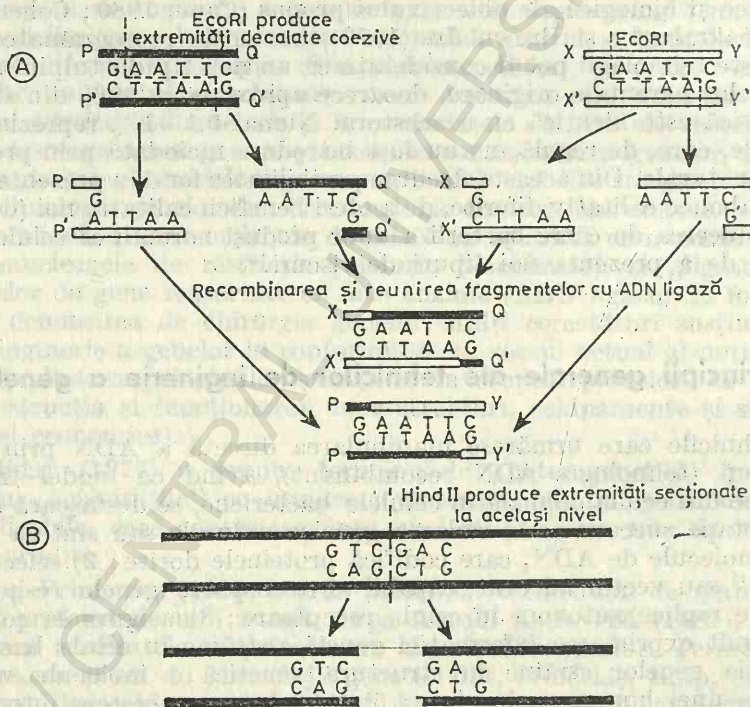


Fig. 329. — A. Restrictaza *Eco RI* produce secționări decalate simetric față de centrul situsului de recunoaștere. Extremitățile adezive produse se pot lega de extremități determinate de aceeași enzimă, indiferent de originea moleculei de ADN. B. Restrictaza *Hind II* secționează ADN în axul de simetrie a situsului de recunoaștere, producând extremități secționate drept (după Watson și colab., 1983).

Deoarece cele mai multe situsuri de recunoaștere sînt palindromice, prelungirile monocatenare formate de o enzimă dată la extremitățile moleculei de ADN sînt complementare și, ca urmare, „lipicioase” (coezive), fapt care asigură legarea lor eficientă pe bază de complementaritate, indiferent de proveniența moleculelor de ADN. Mărimea segmentului de ADN

obținut este determinată de mărimea situsului de recunoaștere al restric-tazei și respectiv de frecvența cu care acest situs este întâlnit de-a lungul moleculei de ADN. Practic, cu cât situsul de recunoaștere este mai mic, cu atât dimensiunea medie a fragmentelor obținute este mai redusă, deoa-rece o secvență de 4 nucleotide se găsește de 12 ori mai frecvent decât o secvență de 6 nucleotide. Ca urmare, o restricțază (*Hpa II* sau *Hae III*) care recunoaște un situs format din 4 nucleotide produce fragmente de ADN formate din câteva perechi până la câteva sute de perechi de nucleotide, având deci mai rar șansa de a conține o genă întreagă. Enzimele de restricție care recunosc secvențe formate din 6 nucleotide (*Eco RI*, *Bam HI*, *Hind III*) produc fragmente cu 1 000—20 000 de nucleotide, care foarte frecvent conțin gena căutată, mai ales dacă nu este situată chiar în situsul de clivare (Murray, 1980). Ușurința cu care pot fi izolate diferitele gene utile depinde de localizarea lor pe cromosomi.

Pe baza efectelor fenotipice și a organizării lor în cromosomi, genele pot fi împărțite în următoarele categorii, cu dificultăți crescînde de izolare (Malik, 1980):

1) *genele simple*, care codifică enzimele monomere, ARNt, ARNr etc. și care sînt cel mai ușor de izolat;

2) *genele complexe* pentru proteinele multimerice (agregate de subuni-tăți polipeptidice diferite — ca triptofan sintetaza, unele hidrolaze etc.), care, în unele cazuri, nu sînt grupate;

3) *operonii* (*lac*, *his*);

4) *reglonii*, minioperoni dispersați pe cromosomi, care controlează anumite funcții biosintetice (de exemplu, sinteza argininei), prin reacții reglate coordonat;

5) *reglonii multipli*, activi în sinteza antibioticelor, din precursori ai mai multor căi diferite.

După izolare, genele trebuie îmbogățite numeric prin localizare pe plasmide sau fagi, clonarea și replicarea acestora, urmată de reisolare și purificare.

2) Fragmentarea mecanică a ADN

Moleculele de ADN d.c. lungi sînt suficient de rigide pentru a fi ușor rupte de forțele hidrodinamice, produse prin agitarea lor în soluție. Agitarea în mixer („Waringblender”), 30 min, la 1 500 t/min, determină formarea unei populații de segmente lungi de ~8 kbp, în timp ce ultra-sunetele asigură producerea de segmente de ~300 pb. În ambele cazuri, fragmentarea este aleatorie și segmentele nespecifice formate au scurte extremități m.c.

3) Sinteza ADN dublu catenar complementar (ADNc)

Obținerea și clonarea directă a ADN genomic este tehnic mai difi-cilă. De aceea, s-a recurs la o tehnică indirectă de sinteză a genei, sub formă de ADNc („copy DNA”; ADN d.c. complementar), pornind de la ARNm specific corespunzător. În acest scop ARNm este izolat din orga-nul în care gena dorită se exprimă la maximum. În condiții fiziologice favorabile, un anumit tip de ARNm poate reprezenta între 0,1 și 10% din

cantitatea de ARNm celular total. În unele cazuri însă, el este prezent în cantități foarte mici. Astfel ARNm pentru factorul IX de coagulare este prezent în ficat în cantități extrem de mici ($\sim 1-10$ molecule). Uneori, izolarea și identificarea ARNm presupune anumite dificultăți. În general, identificarea se face prin determinarea capacității de a controla sinteza unei proteine specifice în sisteme acelulare sau prin hibridare cu oligonucleotide sintetice.

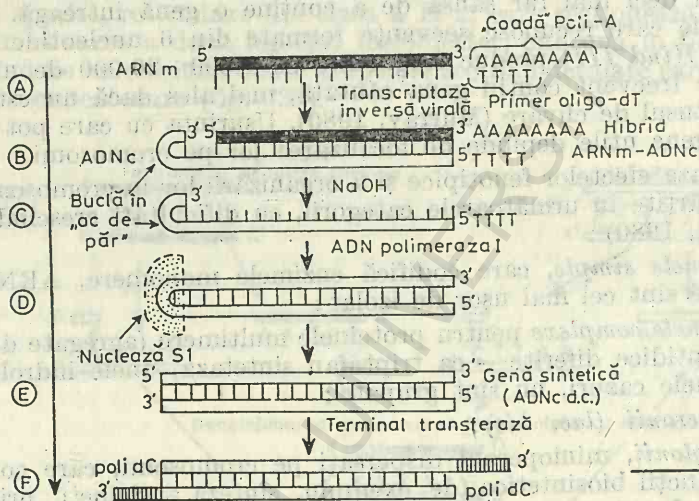


Fig. 330. — Sinteza unei gene pe calea ARNm \rightarrow ADN complementar (ADNc), pornind de la ARNm izolat din celule (A—F) (după Berkaloff, 1981).

Sinteza ADNc se face după următoarea schemă (fig. 330) : A. Într-un virtual toate moleculele de ARNm de la eucariote au la extremitatea 3'—OH o scurtă „coadă” m.c. poli-A, i se adaugă aceștia un mic segment oligonucleotidic poli-T, cu care se va hibrida, pe bază de complementaritate. B. Segmentul poli-T servește ca primer pentru transcriptază inversă virală, care va forma o catenă de ADN, copie complementară (ADNc) față de ARNm. Rezultă un hibrid ARNm—ADNc, în care ADNc prezintă o buclă, rezultată din activitatea enzimei, care formează la extremitatea 3' a ADNc un scurt fragment autocomplemen ar, ce se repliază ca un cârlig (C), după îndepărtarea ARNm prin hidroliză alcalină (NaOH). Extremitatea liberă a buclei de ADN funcționează ca un primer foarte eficient pentru acțiunea ADN polimerazei I de la *E. coli*, care termină sinteza genei, polimerizând catenă a doua a ADNc (D). În faza următoare, endonuclează specifică S1 obținută din *Aspergillus oryzae* efectuează incizii monocatenare și îndepărtează bucla în ac de păr, producând astfel o moleculă de ADN d.c. (E), cu extremități drepte, corespunzând genei sintetizate, care poate fi inserată în plasmida-vector. Metoda este limitată la acele proteine al căror ARNm se acumulează în citoplasmă (Maniatis, 1976).

4) Sinteza chimică a genei

Prima sinteză chimică a unei gene, efectuată de Khorana și colab., (1970), a fost considerată, pe drept cuvânt, ca marcând debutul ingineriei genelor, ca domeniu de activitate. Sinteza s-a făcut sub formă de mici fragmente oligonucleotidice, care au fost ulterior reunite pentru a forma segmentul complet din molecula de ADN ce codifică ARNt tirozină (fig. 331). Din cele 207 pb, 126 situate în secțiunea centrală reprezintă gena pro-

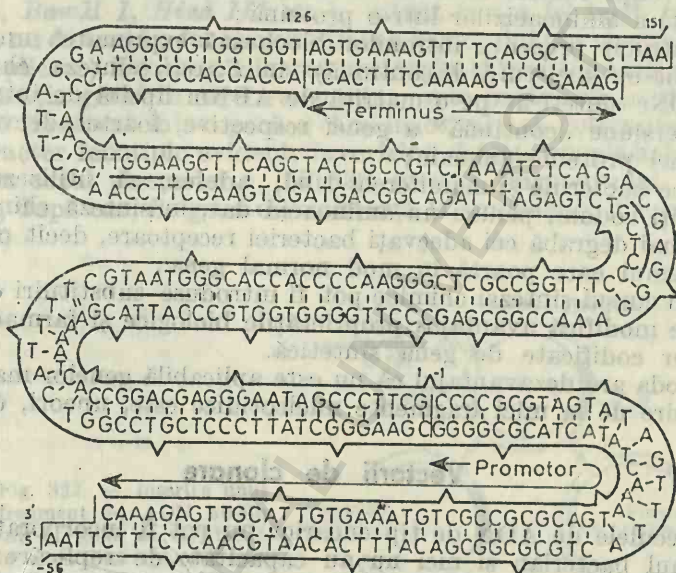


Fig. 331. — Structura primei gene sintetizate — ARNt tirozină — cu menționarea elementelor de reglare „start” și „stop”. Sînt marcate diferitele segmente sintetizate chimic separat și reunite ulterior pentru a forma molecula completă de ADN.

priu-zisă, precedată de un segment promotor de 56 pb, cu rol de inițiere, și urmată de un segment „terminator”, corespunzînd elementelor de reglare stop.

Ryan (1976) a demonstrat că gena sintetică poartă același mesaj și funcționează la fel de precis și de eficient ca și gena naturală după care a fost construită. Adăugată unei populații de fagi *E. coli* defectivi, cu incapacitate de a încorpora tirozina în structura unor proteine cu rol esențial pentru „supraviețuire” și replicare, gena sintetică restabilește această proprietate.

Ulterior, tehnica sintezei ADN a fost perfecționată de Narang și colab., (1979), fapt care permite sinteza chimică neambiguă a unor dozoxiribonucleotide scurte, cu secvențe de baze definite, printr-o tehnică relativ simplă, eficientă și rapidă și apoi asamblarea lor în ordine corectă pentru a reconstitui informația genetică originală. În acest mod s-au realizat sinteza genei somatostatinei (Itakura și colab., 1977), a insulinei (Hsiung

și colab., 1979; Goeddel și colab., 1979), regiunea operator *lac* (Bahl și colab., 1978) etc. În prezent, există „mașini de gene”, care, asistate de un microprocesor, sînt capabile să facă pe baza unei secvențe date, sinteza specifică a unor scurte molecule m.c. de ADN (~40 de nucleotide) automat și foarte rapid asigurînd legarea unui nucleotid la fiecare 30 min. (Hopwood, 1981).

Sinteza chimică a ADN are o serie de avantaje:

1) permite producerea unei gene funcționale, chiar dacă nu se cunoaște secvența bazelor în ADN natural, utilizînd secvența (mai ușor de determinat) a aminoacizilor într-o proteină;

2) întrucît prezența intronilor blochează exprimarea unei gene de tip eucariot cu structură discontinuă) în *E. coli*, sinteza chimică, asemenea ADNc sintetizat pe o matriță de ARNm lipsită de introni furnizează o versiune „continuă” a genei respective, foarte adecvată pentru sinteza unei proteine animale;

3) deoarece bacteriile și mamiferele tind, adesea, să utilizeze preferențial anumiți codoni, pentru un aminoacid dat, în sinteza chimică pot fi utilizați mai degrabă cei adecvați bacteriei receptoare, decît cei preferați de organismul care poartă în mod normal gena;

4) în cursul sintezei chimice pot fi introduse substituiri de aminoacizi, care modifică avantajos proprietățile biologice și farmacologice ale proteinelor codificate de gena sintetică.

Metoda are dezavantajul că nu este aplicabilă genelor mari, a căror reconstituire de la mici fragmente nucleotidice este, uneori, dificilă.

Vectorii de clonare

Moleculele de ADN de tip eucariot nu pot fi încorporate direct în cromosomul bacterian și nici nu au capacitate de replicare autonomă. Replicarea lor într-un sistem biologic (de exemplu, celula bacteriană) este condiționată de integrarea prealabilă într-o moleculă de ADN, capabilă de replicare autonomă numită *vector*, *vehicul de clonare* sau *purător molecular* („molecular carrier”). Vehiculul reprezintă un intermediar cu sistem de replicare propriu, capabil să integreze un fragment de ADN străin și să-l transporte de la exterior în celulă, ca „pasager” („passenger ADN”), la adăpost de acțiunea nucleazelor, asigurînd apoi, replicarea acestuia odată cu propriile sale gene. În această categorie intră plasmidele, unele virusuri bacteriene (fagii λ , M13 etc.), unele virusuri ale plantelor (*Caulimovirus* — tip virusul mozaicului conopidei etc.) sau animale (SV40), precum și moleculele create artificial de tipul cosmidelor.

Particularitățile unui vehicul ideal

Moleculele de ADN utilizate ca vehicul sau vector trebuie să îndeplinească o serie de condiții:

1) Să aibă dimensiuni mici și să fie lipsite de informație genetică necesară. Moleculele mici sînt mai rezistente față de lezarea prin agitare mecanică; în cazul plasmidelor sînt prezente, de regulă, în număr de mai mare de copii/celulă și au șanse reduse de a purta un număr mare de situsuri de restricție. Plasmidele foarte mari (în care s-au inserat fragmente mari de

ADNc) sînt instabile și tind, pe măsură ce se replică, să dea naștere unor plasmide mai mici, din care sînt eliminate treptat cantități crescînde de ADN inserat. Segmentele genetice ce nu sînt permanent necesare plasmidei tind invariabil să fie pierdute, deoarece plasmidele mai mici se replică mai repede.

2) Moleculele de ADN-vector trebuie să fie capabile de replicare autonomă în celula-gazdă și „obișnuite” — deci tolerate de ea.

3) Vehiculul de clonare ideal trebuie să conțină în structura sa un singur situs de recunoaștere pentru enzimele de restricție folosite uzual (*Eco RI*, *BamH I*, *Hind III* etc.), situat în așa fel încît inserția ADN străin să nu distrugă o funcție esențială a vectorului (de exemplu, capacitatea de replicare). Deoarece clivarea vectorului și inserția ADN străin inactivează funcția genei în care s-a produs, este preferabil ca situsul de restricție să fie situat într-o genă a cărei inactivare să determine modificarea unui caracter fenotipic evident, favorizînd detectarea plasmidelor himere. Astfel, în cazul plasmidei *p BR 322*, inserția fragmentului străin poate inactiva, după caz, fie gena de rezistență la ampicilină, fie la tetraciclină (fig. 332).

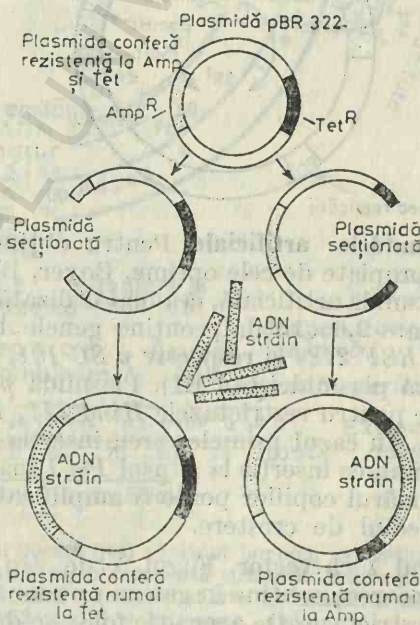


Fig. 332. — Inserția unui fragment de ADN străin într-o genă de rezistență la ampicilină (*Amp^R*) sau la tetraciclină (*Tet^R*) a plasmidei *p BR 322* inactivează gena respectivă, lăsînd-o însă pe cealaltă funcțională (după Watson și colab., 1983).

4) Vehiculul ideal trebuie să fie ușor de izolat și de purificat, și să fie sensibil la aceleași endonucleaze de restricție care au fost folosite pentru obținerea segmentului de ADN „străin”, ce urmează să fie inserat în structura sa.

5) El trebuie să conțină determinanți genetici care să confere celulei-gazdă caracteristici fenotipice simple (rezistență la antibiotice, auxotrofie, imunitate la colicine sau fagi, capacitatea de a produce un anumit

tip de plajă de liză) sau oricare alt marker ușor de recunoscut, care permite separarea ușoară a celulelor transformate de cele normale (Boyer, 1977; Murray, 1980).

Plasmidele posedă o serie de proprietăți intrinsece care le fac potrivite pentru funcția de vehicul de clonare. Plasmida Col E1 (4,2 Mdal), utilizată frecvent ca vector pentru clonarea ADN, codifică colicina E1, o proteină cu proprietăți antibiotice a cărei sinteză este normal represată, dar care este indusă în prezența mitomicinei. De aceea, utilizarea ei este recomandabilă pentru clonarea genelor când se urmărește controlul asupra inducției produșilor. Plasmida Col E1 conține cîte un situs unic pentru enzimele *Eco* I și *Sma* I. Această plasmidă și implicit ADN inserat în structura sa poate fi amplificată pînă la 1 000 copii/celulă, permițînd obținerea unor mari cantități de ADN clonat (Beale și Knowles, 1978). Plasmidele pot încorpora fragmente mari de ADN străin (pînă la ~20 000 pb, respectiv ~20 de gene bacteriene cu dimensiuni medii).

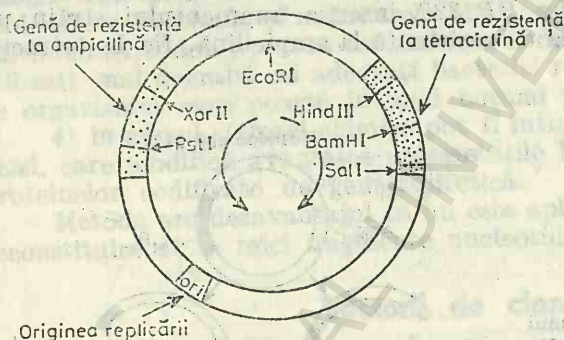


Fig. 333. — Structura plasmidei *p BR 322*, cu indicarea situsurilor de recunoaștere și clivare ale enzimelor de restricție cu situs unic. Săgețile din interiorul cercului indică direcția de transcripție a genelor *Amp^R* și *Tet^R* (după Old și Primerose, 1980).

Plasmidele artificiale. Pentru obținerea unor vectori cu caractere cît mai apropiate de cele optime, Boyer, Bolivar și colab., (1977) au construit plasmida artificială, cea mai utilizată în prezent, denumită *p BR 322*. Ea are g.m. ~2,6 × 10⁶ dal, conține genele *Amp^R* și *Tet^R* provenite de la plasmidele *p RSF 2124* și respectiv *p SC 101*, elementele de replicare ale pMB 9 (similară plasmidei Col E1). Plasmida *p BR 322* conține, în plus, situsuri unice pentru restricțiile *Hind* III, *Bam* H I, *Sal* I, *Pst* I și *Eco* R I (fig. 333). În cazul primelor trei, inserția ADN străin inactivează genele *Tet^R*, în timp ce inserția la situsul *Pst* I inactivează gena *Amp^R*. Au avantajul că numărul copiilor poate fi amplificat, prin adăugarea de cloramfenicol la mediul de creștere.

Fagul λ ca vector. Fagul λ de tip sălbatic nu poate fi utilizat ca vector, deoarece conține în genom un număr mare de situsuri-țintă pentru diferite restricții. De aceea, se folosesc derivați ai săi, cu un singur situs-țintă în care poate fi inserat ADN străin, numiți *vectori de inserție* (insertional vectors) sau cu două situsuri ce delimitează un fragment de ADN ce poate fi îndepărtat și înlocuit cu ADN străin numiți *vectori de înlocuire* („replacement vectors”).

Utilizarea fagului λ ca vector de clonare se bazează pe faptul că multe gene din regiunea sa centrală — între ~27% (Szylay, 1979) și ~35% din genomul de tip sălbatic — nu sînt esențiale pentru creșterea litică (Malik, 1980) și, ca urmare, pot fi eliminate și înlocuite cu ADN străin, fără efecte

grave asupra „viabilității” fagului (fig. 334). Aceasta depinde, în primul rând, de mărimea globală a moleculei de ADN, care trebuie înglobată în capsida fagică și care variază obligatoriu între 80 și 105% din aceea a

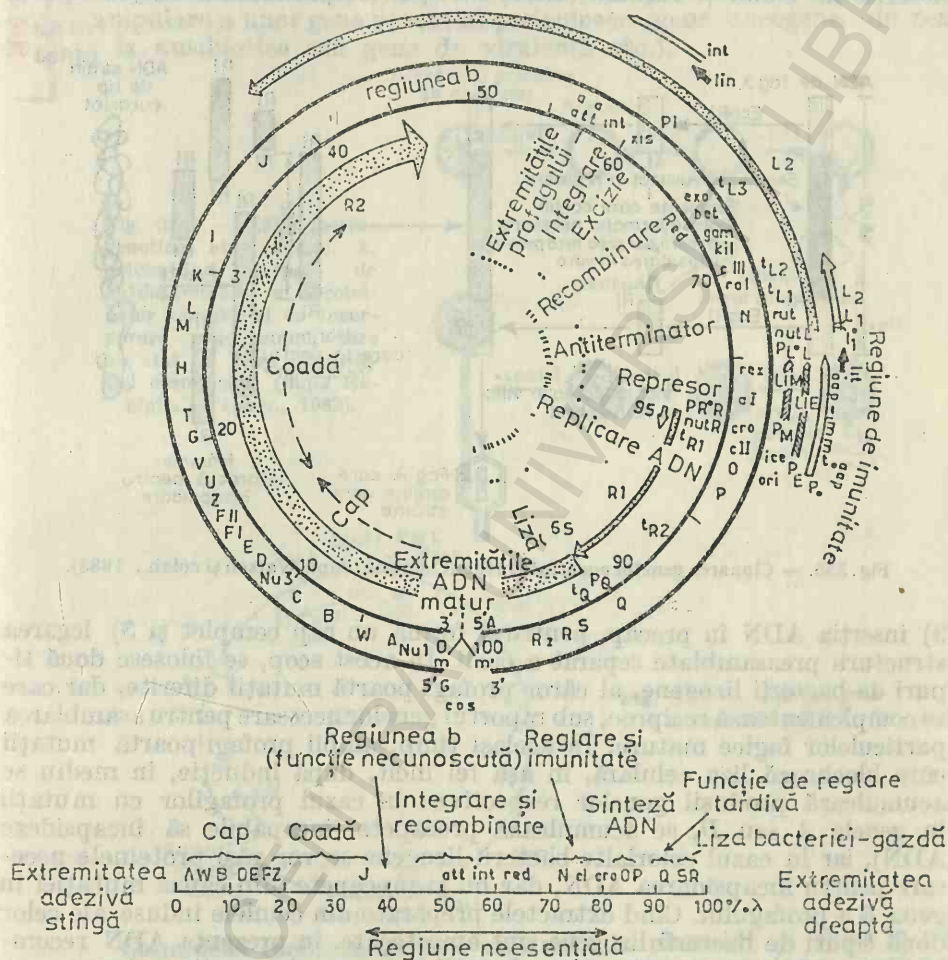


Fig. 334. — Harta genetică circulară (sus) și lineară (jos) a fagului lambda, evidențiind poziția fizică a unor gene și semnificația lor funcțională; m, m' reprezintă situsurile la care prin clivare endonucleolitică se formează extremitățile 5' coezive (cos) având câte 12 nucleotide complementare (după Malik, 1982 și Old și Primerose, 1980).

genomului fagic de tip sălbatic. Datorită acestui fapt, formarea de particule fagice infecțioase este chiar dependentă de inserția de ADN străin, deoarece în lipsa acestuia, genomul fagic rămas după îndepărtarea regiunii necesare este prea scurt pentru a fi încapsidat (Murray, 1980) (fig. 335).

Mărimea fragmentului străin care poate fi încorporat este, după Watson (1983), de 15 kbp, iar după Old și Primerose (1980), de 22 kbp.

Vectorii fagici derivați au un situs unic de restricție *Eco RI*, localizat în așa fel încât lasă neatins segmentul necesar pentru replicare.

Morfogeneza și încapsidarea ADN *in vitro* mimează cele trei faze descrise de Hohn și Kabura (1977) *in vivo*: 1) producerea de precapete;

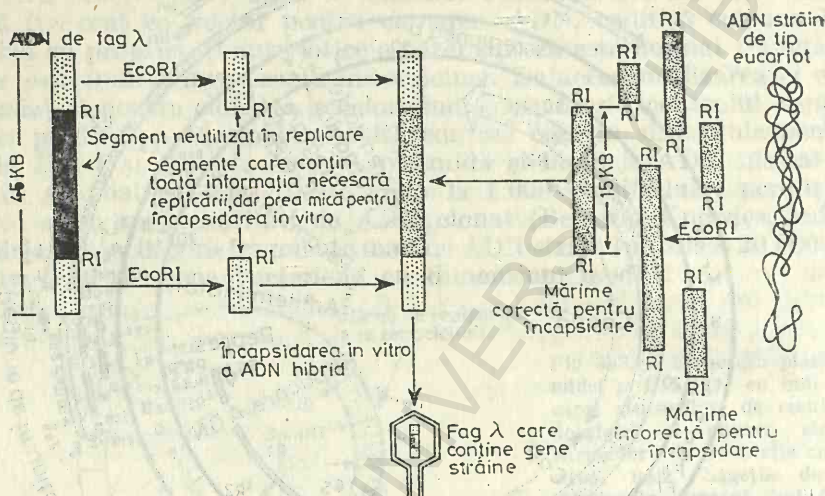


Fig. 335. — Clonarea genelor eucariote în fagul lambda (după Watson și colab., 1983).

2) inserția ADN în precap, pentru a forma un cap complet și 3) legarea structurii preasamblate separat a cozii. În acest scop, se folosesc două tipuri de bacterii lizogene, ai căror profagi poartă mutații diferite, dar care se completează reciproc, sub raportul genelor necesare pentru asamblarea particulelor fagice mature. În același timp, ambii profagi poartă mutații care blochează liza celulară, în așa fel încât, după inducție, în mediu se acumulează produșii genelor respective: în cazul profagilor cu mutații în genele *A* sau *D*, se acumulează precapete (incapabile să încapsideze ADN), iar în cazul celorlalte bacterii lizogene se vor găsi proteinele necesare pentru încapsidarea ADN, dar nu și precapete. din cauza mutației în gena *E* a profagului. Când extractele preparate din celulele induse ale celor două tipuri de bacterii lizogene sint amestecate, în prezența ADN recombinant exogen, acesta este „împachetat” în precapete, pentru a forma particule fagice mature. Infecția bacteriilor se face prin mecanismul normal. În celulă, ADN λ hibrid se circularizează, este replicat și lizează celula bacteriană.

Ca vector, fagul λ are o serie de avantaje: el poate purta un segment relativ mare de ADN străin, infecția bacteriilor este foarte eficientă, iar selecția clonelor hibride este ușor de realizat.

Blattner și colab. (1977) au construit un număr mare de vectori derivați din fagul λ — fagii *Charon* — cu modificări importante mutaționale în regiuni esențiale ale genomului și ale poziției unor situsuri de restricție. Acești fagi — numiți astfel după bătrînul barcagiu din mitologia greacă, ce transporta spiritele celor morți peste riul Styx, pot funcționa

ca vehicule sigure, care pot fi stăpinite biologic datorită imposibilității de „supraviețuire” în afara unor condiții de mediu riguros controlate.

Datorită acestui fapt, ei pot fi utilizați cu precădere în experimentele de manipulare a unor gene potențial periculoase (gene oncogene, de rezistență la antibiotice sau gene de virulență etc.).

Precap cu proteine
de eșafodaj

Precap

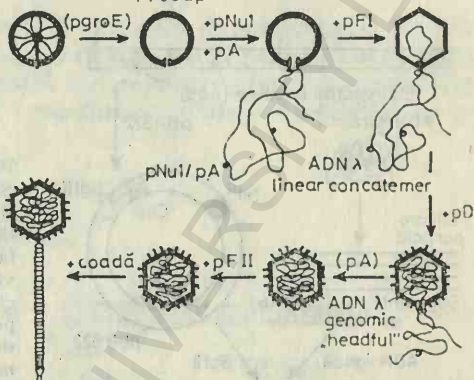


Fig. 336. — Căile morfogenetice ale fagului λ , evidențiind etapele de autoasamblare a proteinelor capului și de incorporare a genomului, care au stat la baza construcției cosmidelor (după Maniatis și colab., 1982).

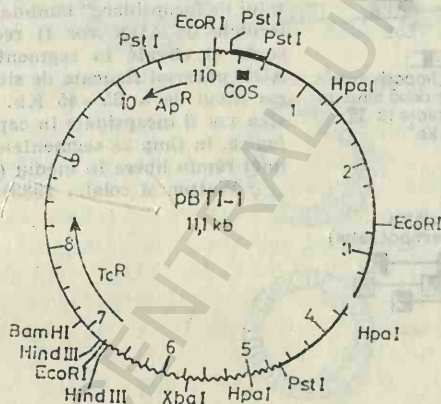


Fig. 337. — Harta genetică a cosmidei pBT 1-1.

Cosmidele. Clonarea genelor eucariote în plasmide și chiar în genomul fagic este limitată la segmente cu o anumită dimensiune, insuficientă pentru genele mari și, mai ales, pentru unele gene adiacente.

Cosmidele sau plasmidofagii sînt vectori artificiali care conțin un fragment de fag λ , ce include secvențele terminale *cos*, necesare pentru încapsidare, o genă de rezistență la un antibiotic și un situs unic pentru o anumită enzimă de restricție provenite de la o plasmidă (Collins și colab., 1978). Este știut că în cursul replicării normale a fagului λ , sute de molecule de ADN reunite prin situsurile *cos* adezive, terminale („cohesive end site”), formează un genom concatemer. Sistemul de încapsidare („packaging system”) recunoaște o mică secvență din apropierea acestor situsuri și clivează molecula poligenomică în unitățile componente, permițînd incorporarea ADN în capsidele fagice (fig. 336) atît *in vivo*, cît și *in vitro* (Hohn, 1975).

Cosmidele pot fi incorporate în particule pseudofagice și folosite ca vectori pentru clonarea unor fragmente mari de ADN străin, deoarece mimează comportamentul ADN genomic. Ca și în cazul ADN λ , incorporarea lor în capsulele fagice este limitată de o singură restricție, reprezentată de mărimea moleculei care trebuie să fie corespunzătoare genomului fagic normal (secvențele *cos* trebuie să fie la o distanță de ~23–32 Mdal,

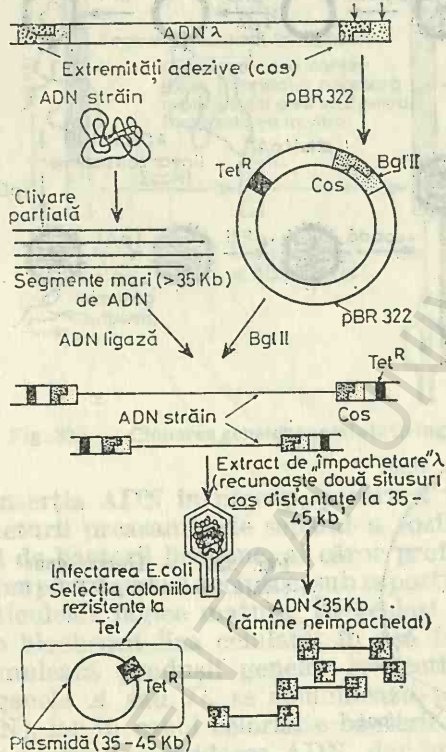


Fig. 338. — Clonarea cosmidelor. Siturile adezive *cos* ale fagului λ sînt clonate în plasmida *p BR 322*, lăsînd intactă gena de rezistență la tetraciclină (*Tet^R*). ADN provenit din celulele eucariote este clivat cu o enzimă de restricție pentru a obține fragmente mari de ADN, care sînt inserate în plasmidele ce conțin situsurile *cos* fagice. După adăugarea „extractului de încapsidare” lambda, moleculele de ADN vor fi recunoscute și clivate în segmente de ADN eucariot flancate de situsuri *cos* lungi de ~ 35–45 Kb. Acestea vor fi încapsidate în capetele fagice, în timp ce segmentele mai mici rămîn libere în mediu (după Watson și colab., 1983).

care corespunde la ~75–105% din mărimea ADN λ). Segmentele mai mici, chiar dacă sînt delimitate de situsuri *cos*, nu sînt încapsidate (Hohn și Collins, 1975). Cosmida *p BT I–I*, spre exemplu (fig. 337), avînd 11 kbp (~ $7,3 \times 10^6$ dal), conține, pe lîngă segmentele *cos* λ , genele de rezistență *Amp^R* și *Tet^R*, precum și un situs unic de restricție *Bam H I*, de la plasmida *p BR 322*. Ea poate încorpora un segment de ADN străin, lung de 38–52 kbp (Morris, 1981).

Cînd moleculele de cosmide recombinante sînt puse în contact cu capetele fagice parțial asamblate, ele sînt incorporate producînd *pseudofagi transductori*, ce pot fi folosiți pentru a infecta cu mare eficiență celule de *E. coli-K 12* sensibile. După injectarea în celula bacteriană, cosmida recombinantă se circularizează și se comportă ca o moleculă de plasmidă hibridă (ADN plasmidial + ADN străin eucariot + situsuri *cos* λ) și nu ca un fag (fig. 338). Celulele transformate sînt selecționate pe baza rezisten-

tei lor la antibiotice. Cosmidele sînt vehiculi care permit clonarea unui fragment mare de ADN străin (~ 10 Mdal), deși eficiența lor este uneori mai mică decît a fagilor (Mayer și colab., 1979).

Clonarea moleculară și construcția moleculelor de ADN hibride

Clonarea moleculară reprezintă procesul de construcție a unor molecule de ADN hibride, prin inserția de informație genetică străină într-un vector (vehicul) adecvat, capabil de replicare independentă. Hibridul rezultat este utilizat pentru a transforma celulele bacteriilor receptoare

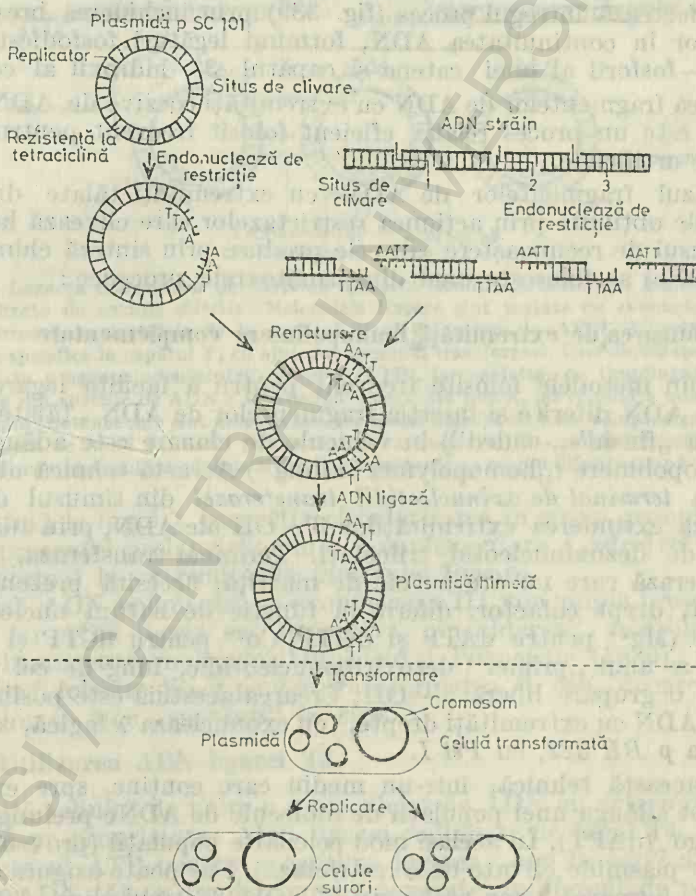


Fig. 339. — Clonarea unui segment de ADN natural în plasmida p SC 101 și introducerea lui în bacteria *E. coli* prin transformare genetică. Plasmida este clivată cu endonucleaza *Eco RI* la un situs unic, care nu interferă cu funcția genelor necesare pentru replicare și cu cele de rezistență la tetraciclină (după Cape, 1979.)

(Szalay, 1979). Pentru integrarea fragmentelor de ADN străin în vehiculul de clonare se recurge la una din următoarele tehnici :

Utilizarea fragmentelor de ADN produse de restrictaze

Modalitatea cea mai simplă de încorporare este aplicabilă moleculelor obținute prin acțiunea enzimelor de restricție din clasa a II-a, care clivează ADN la distanțe egale față de axul de simetrie al secvenței de recunoaștere (de tip palindromic), producând fragmente de molecule de ADN d.c., cu prelungiri monocatenare complementare „adezive”. În cazul în care atât molecula de ADN-vehicul, cât și aceea care urmează a fi încorporată în el au fost clivate de aceeași enzimă de restricție, fragmentele respective vor prezenta extremități adezive complementare și se pot hibrida, indiferent de proveniența lor. Unirea lor inițială se face prin legături de H, după care ADN ligaza din *E. coli*, avînd drept cofactor NAD^+ , perfectează întregul proces (fig. 339) prin închiderea breșelor sau întreruperilor în continuitatea ADN, formînd legături fosfodiester între capătul 5'—fosforil al unei catene și capătul 3'—hidroxil al celeilalte.

Legarea fragmentelor de ADN cu extremități coezive de ADN ligaza din *E. coli* este un proces relativ eficient folosit frecvent pentru a crea recombinări artificiale.

În cazul fragmentelor de ADN cu extremități tăiate drept (de exemplu, cele obținute prin acțiunea restrictazelor care clivează la același nivel în situsul de recunoaștere sau cele produse prin sinteză chimică sau de tipul ADNc) se folosește unul din următoarele procedee :

1) Adăugarea de extremități homopolimere complementare

Una din metodele folosite frecvent pentru a facilita legarea unor molecule de ADN diferite și inserția fragmentelor de ADN „tăiate drept” („blunt- sau „flush”- „-ended”) în vehicule de clonare este adăugarea de „cozi” homopolimere („homopolymer tailing”) Această tehnică utilizează proprietatea *terminal-de oxinucleotidil transferazei* din timusul de vițel de a cataliza extinderea extremităților 3'—OH ale ADN, prin adăugarea progresivă de dezoxinucleotid trifosfați. Terminal transferaza, singura ADN polimerază care nu are nevoie de matrită, necesită prezența unui ion bivalent, drept cofactor, diferit în funcție de natura nucleotidelor polimerizate (Mg^{2+} pentru dATP și dGTP, Co^{2+} pentru dCTP și dTTP), precum și a unui „primer” dezoxiribonucleotidic, lung de cel puțin 3 baze, avînd o grupare liberă 3'—OH. Crearea acestuia este posibilă prin pretratarea ADN cu extremități drepte, cu exonucleaza λ fagică, sau pentru plasmida p BR 322, cu *Pst I*.

Cu această tehnică, într-un mediu care conține, spre exemplu, dATP, se pot adăuga unei populații de molecule de ADNc prelungiri m.c. de tipul oligo (dAPT), în același mod celeilalte populații (provenite spre exemplu din plasmide clivate cu o restrictază), i se poate asigura în prezența dTTP, formarea unor prelungiri 3'—OH de tipul oligo (dTTP). Se obțin astfel molecule de ADN cu „cozi” homopolimere complementare, care pot funcționa ca extremități adezive. În mod similar, se pot obține extremități coezive utilizînd pentru sinteza homopolimerilor complementari nucleotidele dCTP și dGTP. Pune în contact, moleculele de ADN

dotate cu „cozi” homopolimere complementare vor forma perechi de baze și vor determina renaturarea („annealing”) și circularizarea moleculei de ADN (fig. 340). Întregul procedeu reproduce în laborator fenomenul des-

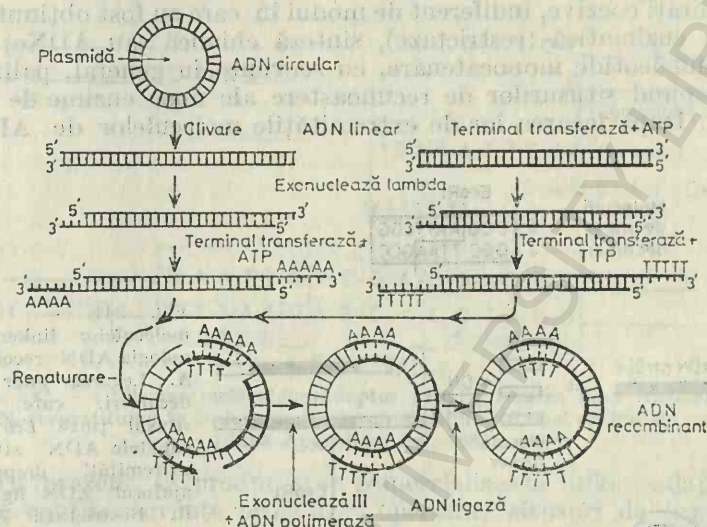


Fig. 340. — Legarea moleculelor de ADN cu ajutorul terminal transferazei implică mai multe etape, catalizate de enzime diferite. Moleculele lineare sunt tratate cu exonucleaza lambda, care îndepărtează nucleotidele de la capătul 5' al catenelor de ADN. Ulterior, se adaugă nucleotidele specifice la capătul 3', cu ajutorul terminal transferazei. Una dintre speciile de ADN este tratată în prezența adenozintrifosfatului (ATP), iar cealaltă, cu timidintrifosfat (TTP). Astfel, una din speciile de ADN i se adaugă o secvență poli A, iar celeilalte una poli T. Când cele două tipuri de molecule sunt amestecate, formează perechi de baze complementare, renaturând o moleculă de ADN de. ADN polimeraza și exonucleaza III „umplu” breșele, iar ADN ligaza închide complet molecula formată din două segmente cu origini diferite (după Cohen, 1975).

cris în natură la fagul λ , respectiv circularizarea *in vivo* a genomului fagic, datorită prezenței prelungirilor m.c. complementare („adezive”) prezente în mod normal la extremitățile moleculei lineare.

Final, ADN polimeraza și exonucleaza III vor umple breșele rămase deschise, iar ADN ligaza va definitiva „închiderea” soluțiilor de continuitate în structura moleculei. După Old și Primerose (1980), moleculele reunite pot fi folosite direct pentru transformarea *E. coli*, deoarece repararea breșelor se face „spontan” *in vivo*.

2) Utilizarea ADN ligazei T4

O altă tehnică de unire a moleculelor de ADN cu extremități drepte se bazează pe proprietatea ADN ligazei codificate de fagul T4, care necesită cofactorul ATP pentru a cataliza legarea „cap la cap” a unor segmente de ADN tăiate drept, complet separate, indiferent de proveniența lor, fără a mai fi necesară crearea unor extremități adezive naturale sau artificiale. Reacția necesită doar ca extremitățile celor două fragmente „să se găsească” unele cu altele.

Procesul decurge lent și este puțin eficient, tocmai datorită faptului că „întilnirea” celor două fragmente este supusă hazardului.

3) Utilizarea moleculelor linker

În ultimul deceniu au fost produse și comercializate o gamă largă de molecule *linker*, utilizabile pentru unirea segmentelor de ADN lipsite de extremități coezive, indiferent de modul în care au fost obținute (rupere mecanică, enzimatică (restrictaze), sinteză chimică sau ADNc). Linkerii sînt oligonucleotide monocatenare, cu secvențe, în general, palindromice, care corespund situsurilor de recunoaștere ale unor enzime de restricție (fig. 341). După legarea lor de extremitățile moleculelor de ADN tăiate

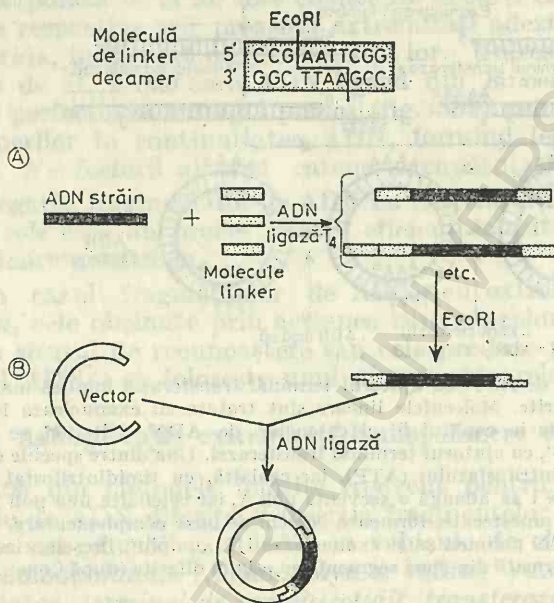


Fig. 341. — Utilizarea moleculelor linker în tehnologia ADN recombinant
A. Legarea unor linkerilor decameri, care conțin situsul țintă *Eco RI* la capetele ADN străin, cu extremități drepte, cu ajutorul ADN ligazei T4.
B. Restrictaza *Eco RI* creează extremități adezive, care permit încorporarea ADN străin într-o plasmidă-vector, tratată cu aceeași enzimă (după Old și Primerose, 1980).

drept, cu ajutorul ADN ligazei T4, ele se reunesc în structuri dublu catenare, cu secvențe simetrice, care reconstituie situsul funcțional de recunoaștere și clivare al unei enzime de restricție. Spre exemplu, linkerii cu secvența 5' CCGAATTCGG 3' conțin situsul de recunoaștere *Eco RI*; 5'CCGGAATTCGG 3' pe cel al restrictazei *Bam HI*, *Hpa III* și *Hap II*; 5'G AAGCTTC 3', *Hind III*, iar 5'CTGCAGG 3', *Pst I* și așa mai departe. Prin adăugarea lor la extremitățile moleculelor de ADN se creează situsuri-țintă pentru acțiunea endonucleazelor de restricție, care produc extremități adezive ce permit clonarea în plasmide tratate cu aceeași enzimă.

Adaptorii sînt o varietate de linkerii sintetizați chimic, care permit de regulă, legarea a două molecule de ADN prevăzute cu extremități coezive, rezultate însă din acțiunea unor enzime de restricție diferite (Bahl, 1978; Malik, 1980). Ei sînt oligonucleotide, în general decamere, m.e., capabile să fuzioneze două situsuri de restricție diferite, unul legat la extremitatea 3'-OH a unei molecule, iar celălalt la extremitatea 5' — fosforil a alteia, reconstituind ambele secvențe.

Fig. 342 ilustrează un tip de adaptor (engl.=adaptor), produs de firma Amersham, Int. care, legînd un fragment *Eco* RI cu altul *Bam* HI, asigură unirea celor două molecule de ADN, refacerea situsurilor de restricție *Eco* RI și *Bam* HI și crearea unui al treilea situs suplimentar,

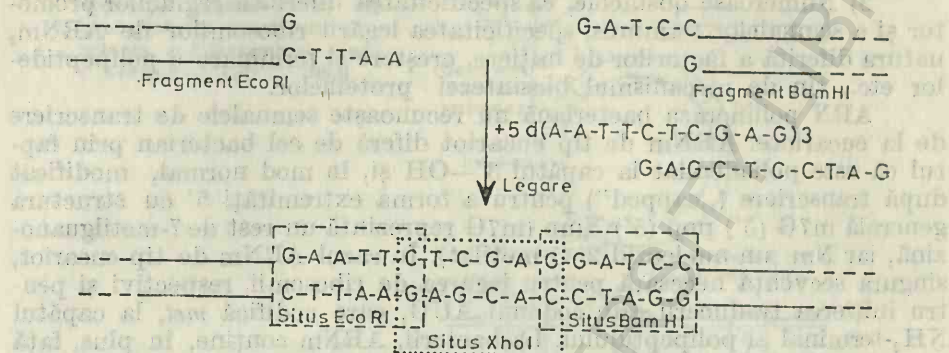


Fig. 342. — Utilizarea moleculelor-adaptor permite legarea unor fragmente de ADN, reconstituind în același timp situsul de acțiune al unei enzime de restricție (după Amersham Co., 1985).

Xho I. În prezent se produce și se comercializează linkeri-adaptori sintetici, care conțin secvențe promotor, operator, situsuri de legare ribosomale, de inițiere și de terminare a sintezei, flancați de ambele părți de situsuri de recunoaștere pentru restricțaze.

Condițiile exprimării genelor eucariote în celula bacteriană

Unele gene eucariote, ca, de exemplu, cele provenite de la levuri, sint exprimate spontan în *E. coli*. Fenomenul este însă, din ce în ce mai rar pe măsură ce genele provin de la organisme mai evoluate. În cazul genelor provenite de la animale sau de la om, simpla inserție într-o plasmidă și transferul în celula bacteriană nu sint suficiente, niciodată, pentru a asigura sinteza unei proteine dorite. Exprimarea genei și sinteza unei proteine funcționale este un proces complex, care implică, pe lângă necesitatea inserției genei într-un cadru de citire corect, transcrierea și traducerea genei respective, prelucrarea produselor transcrierii și traducerii, asigurarea stabilității proteinei etc. De aceea, o genă străină inserată la întâmplare într-o plasmidă are puține șanse să se exprime într-o celulă bacteriană. Chiar dacă ADN străin introdus conține o genă structurală funcțională și elementele de control care dirijează exprimarea ei în organismul original, barierele moleculare la nivelul transcrierii și/sau traducerii genetice reduc sau împiedică exprimarea genelor eucariote clonate în celula bacteriană și invers.

Între principalele diferențe care împiedică exprimarea genelor străine sint de citat următoarele:

1) Genele eucariote au în structura lor secvențe de tipul intronilor, uneori cu lungimi mari care întrerup continuitatea secvențelor cu rol în

codificare (Breanach, 1979). Deoarece procariotele nu conțin introni și nici sistemele enzimatică necesare pentru îndepărtarea lor și producerea de ARN matur, ele nu pot utiliza tipul nou de informație genetică (Murray, 1980; Harris, 1983).

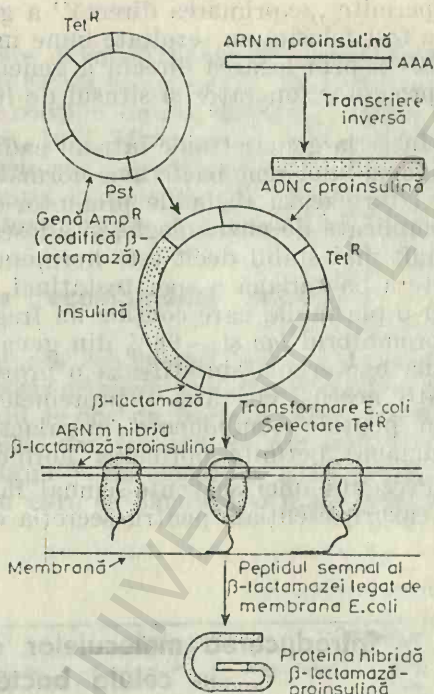
2) Numeroase obstacole, ca specificitatea diferită a regiunilor promotor și a semnalelor terminus, specificitatea legării ribosomilor de ARNm, natura diferită a factorilor de inițiere, creștere și terminare a polipeptidelor etc., țin de mecanismul biosintezei proteinelor.

ARN polimerază bacteriană nu recunoaște semnalele de transcriere de la eucariote. ARNm de tip eucariot diferă de cel bacterian prin faptul că este poliadenilat la capătul 3'-OH și, în mod normal, modificat după transcriere („capped”) pentru a forma extremități 5' cu structura generală m⁷G (5') ppp (5') Nmp (m⁷G reprezintă un rest de 7-metilguanozină, iar Nm un nucleozid 2'-O-metilat). În cazul ARNm de tip eucariot, singura secvență necesară pentru legarea de ribosomii respectivi și pentru inițierea traducerii este codonul AUG, care codifică *met*, la capătul NH₂-terminal al polipeptidului. La bacterii, ARNm conține, în plus, față de codonul AUG, o secvență de 3—12 pb — secvența Shine-Dalgarno — situată în regiunea „leader”, netradusă, a ARNm, cu 3—11 baze în amonte de codonul AUG. Ea este complementară capătului 3' al ARNr 16S și legarea de acesta pe bază de complementaritate are un rol important în stabilizarea complexului de inițiere format între ARNm și ribosom (Steitz, 1979).

3) În sfârșit, deși codul genetic este universal, la procariote există o utilizare preferențială a anumitor codoni ca și a anumitor ARNt pentru exprimarea eficientă a genelor respective (Grosjean și Fiers, 1982). Toate acestea creează o anumită incompatibilitate între informația genetică de tip eucariot și „mașinăria” de sinteză a procariotelor și sînt răspunzătoare de succesul foarte limitat al exprimării genelor eucariote în celula bacteriană. Ca urmare, informația nouă nu se poate exprima eficient decît dacă trece sub controlul elementelor de reglare bacteriene. De aceea, au fost elaborate mai multe strategii, cu scopul de a „înșela” sistemele de recunoaștere și reglare ale celulei bacteriene și a le face să se comporte față de genele eucariote ca față de genele proprii. Astfel, sinteza chimică a genelor poate ocoli inconvenientele decurgînd din prezența intronilor în genele naturale, asigurînd, în același timp, utilizarea codonilor cu semnificații optimizate. În mod similar, clonarea ADNc, sintetizat pe o matrită de ARNm matur, care este lipsit de introni și de toate complicațiile care ar putea decurge din prezența acestora.

După Guarente și Ptashne (1980), condiția minimă necesară pentru exprimarea genelor eucariote în *E. coli* este prezența unui promotor bacterian, iar în molecula de ARNm existența unei secvențe Shine-Dalgarno amplasată corespunzător. Pentru a realiza acest obiectiv, s-a recurs la inserția genelor eucariote într-un vector de clonare, adiacent unui promotor foarte activ de tip procariot (de exemplu, promotorii *lac* și *trp* ai operonilor respectivi de la *E. coli*, promotorul stîng (P_L) al fagului λ sau promotorul constitutiv și mai slab al β-lactamazei) (fig. 343). Aceasta a permis obținerea unor *vectori de expresie*, derivați din plasmide cu un număr mare de copii, fapt care a asigurat și exprimarea mărită a genelor prin amplificare.

Fig. 343. — Clonarea ADNc proinsulină în gena β -lactamazei determină formarea unei proteine hibride, care este secretată de *E. coli* în mediu, datorită prezenței secvenței „semnal” de tip procariot, în porțiunea terminală a β -lactamazei (după Watson și colab., 1983).



În general, pentru a depăși barierele legate de traducerea informației genetice în proteine se recurge la două artificii de tehnică (fig. 344):

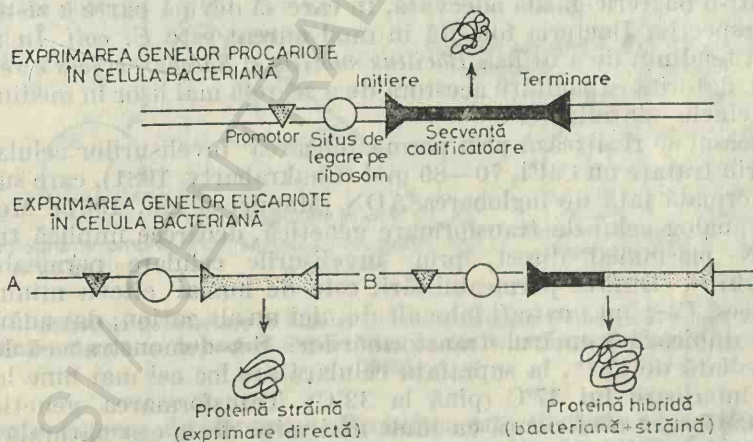


Fig. 344. — Reprezentarea schematică a celor două strategii utilizate pentru exprimarea genelor eucariote în celula bacteriană. A. Legarea genei străine exact adiacent semnalelor din molecula de ADN bacterian și exprimarea ei directă. B. Inserția, într-o regiune codificatoare a genei bacteriene, urmată de producerea unei proteine de fuziune, himeră (după Wetzel, 1980).

A. Legarea genei străine cu propriul său codon inițiator sau cu unul adăugat exact în vecinătatea semnalelor naturale ale bacteriei-gazdă.

Aceasta permite „exprimarea directă” a genei și sinteza proteinei dorite. Tehnica a fost folosită cu rezultate bune în sinteza hormonului de creștere uman (HCU), prin legarea directă a genei semisintetice de elementele de reglare (promotor, operator și situsul de legare ribosomal *lac*).

B. Inserția genei străine într-un cadru de citire adecvat într-o anumită regiune a unei gene bacteriene normale. Această tehnică rezolvă două probleme: furnizează regiunile promotor-operator bacteriene, fără intervenții complicate de enzimologie, și adesea asigură producerea unui polipeptid mult mai stabil decât este hormonul izolat. Tehnica este utilizată în biosinteza bacteriană a somatostatinei, prin legarea genei corespunzătoare într-o plasmidă, care conține un fragment de cromosom *E. coli*, incluzând promotorul *lac* și ~98% din gena β -galactozidazei. În aceste cazuri, celula bacteriană sintetizează o proteină himeră sau de fuziune, cu aproximativ aceeași viteză ca și proteinele proprii normale. Clivarea ei la cele două peptide componente (β -galactozidază bacteriană — somatostatina umană) permite obținerea hormonului activ.

4) Prezența unei secvențe-semnal în structura genei inserate este, în unele cazuri, esențială pentru secreția extracelulară a proteinelor (fig. 343).

Introducerea moleculelor de ADN himere în celula bacteriană

Replicarea plasmidelor recombinante este condiționată de pătrunderea lor într-o bacterie-gazdă adecvată, în care să devină parte a sistemului genetic respectiv. Bacteria folosită în mod curent este *E. coli*. În ultimii ani există tendința de a utiliza *Bacillus subtilis* și *Saccharomyces cerevisiae*, în special, datorită capacității acestora de a secreta mai ușor în mediu unele din proteinele sintetizate.

Procesul se realizează prin permeabilizarea învelișurilor celulare ale *E. coli* prin tratare cu CaCl_2 70—80 mM (Chakrabarty, 1981), care suprimă bariera normală față de înglobarea ADN (Mandel și Iga, 1967). Mecanismul este analog celui de transformare genetică, deoarece implică transferul ADN plasmidial direct, prin învelișurile celulare permeabilizate (Cohen, 1979). Durata permeabilizării este de numai câteva minute. În acest proces, Ca^{2+} nu poate fi înlocuit de nici un alt cation, dar adăugarea de Mg^{2+} dublează numărul transformărilor. S-a demonstrat că legarea ADN, mediată de Ca^{2+} , la suprafața celulară are loc cel mai bine la temperaturi inferioare lui 37°C (până la 32°C). Transformarea genetică indusă de CaCl_2 are o eficiență cu mult mai mică decât cea naturală. Dar, deși se apreciază că din 10 000 de molecule himere numai una singură traversează învelișurile celulare, procesul satisface condițiile de laborator. Se adaugă avantajele decurgând din faptul că moleculele himere de ADN se replică în celula-gazdă, grație sistemului de replicare propriu vectorului, în așa fel încît, prin amplificare, fiecare moleculă himeră dă naștere unei clone moleculare, adică unor populații omogene de plasmide sau fagi, care propagă un segment de ADN determinat.

În cazul plasmidelor, fiecare clonă este inclusă într-o colonie bacteriană care conține ~ 1 milion de celule transformate, iar în cazul fagilor, în fiecare clonă dă o plajă de liză, ce conține, de asemenea, ~ 1 milion de particule fagice (Rambach și Lambert, 1977). Microorganismele rezultate, modificate genetic prin tehnici de inginerie a genelor, conțin informație genetică provenită de la specii cu care, în mod normal, nu au schimburi de material genetic. De aceea, au fost numite *microorganisme chimere*.

Selecția clonelor recombinante specifice

Una din etapele esențiale ale tehnologiei ADN recombinant este reprezentată de detectarea și selecția celulelor bacteriene transformate (care conțin gena dorită) din numărul imens de bacterii prezente în mediu. Această etapă este foarte dificilă, dar tot atât de necesară mai ales în cursul experiențelor de tip „shotgun”*, de clonare a ADN genomic sau a ADNc sintetizat enzimatic, prin care se clonează o mare populație de

Selecția clonelor recombinante

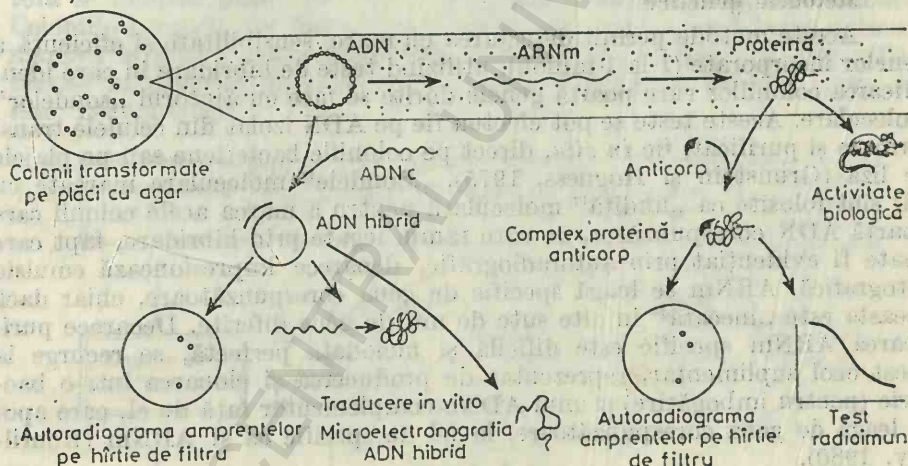


Fig. 345. — Metodele de selectare *in vitro* și *in vivo* a celulelor transformate, care conțin gena dorită, dintr-un amestec de bacterii expuse unui proces de inginerie a genelor (după Wetzel, 1980).

fragmente extrem de eterogene. Problema este, deci, de a selecționa celulele, respectiv coloniile, care conțin un singur tip de ADN străin clonat și anume cel dorit. În acest scop au fost imaginate o serie de tehnici microbiologice, genetice și imunochimice (fig. 345).

* ADN de la *E. coli* (~ 4 milioane pb) are ~ 500 situsuri de recunoaștere pentru enzima *Eco RI*. Prin inserția aleatorie a fragmentelor create se pot clona practic toate genele, pentru a le folosi după izolare pentru manipulări genetice sau biochimice (Watson și colab., 1983). Genomul diploid uman (~ 6×10^9 pb) poate fi clivat cu o enzimă de restricție în aproximativ un milion de fragmente, având o lungime de 100–100 000 pb (Humphries și Williamson, 1983).

Metodele microbiologice

Aceste metode sînt dintre cele mai simple, deoarece se bazează pe evidențierea indirectă a prezenței unui marker genetic, respectiv a unei proprietăți ușor detectabile, ca, de exemplu, rezistența la un antibiotic sau a altei proprietăți noi codificată de gena străină, a unei exigențe de nutriție sau formarea de plaje de liză, în cazul fagilor. În acest mod, pot fi detectate relativ ușor prin teste de selecție („screening”), transformarea unei tulpini-gazdă auxotrofă într-o tulpină prototrofă pentru un anumit caracter marcant.

Dobindirea capacității de a sintetiza o anumită enzimă sau prezența produsilor ei de metabolism se poate face prin teste simple de culoare. Astfel, introducerea genelor *lac* într-o tulpină de *E. coli* defectivă, determină sinteza β -galactozidazei, datorită căreia coloniile clonelor recombinante vor fi colorate roșu-violet pe mediu Mac Conkey (lactoză agar, cu roșu neutru și cristal violet), spre deosebire de coloniile bacteriilor *lac*⁻, care sînt incolore. În mod similar, tulpinile incapabile să hidrolizeze glutamina, lizogenizate de un profag în care s-a inserat gena glutaminazei, pot fi detectate ușor, prin modificarea produsă de eliberarea de NH₃.

Metodele genetice

Aceste metode permit detectarea cu mare sensibilitate și eficiență a genelor încorporate (1 la 1 milion), utilizînd teste de hibridare în care identificarea coloniilor care poartă genele dorite se face cu ajutorul „sondelor” moleculare. Aceste teste se pot efectua fie pe ADN izolat din celulele transformate și purificat, fie *in situ*, direct pe coloniile bacteriene sau pe plajele de liză (Grunstein și Hogness, 1975). „Sondele” moleculare marcate cu ³²P sînt folosite ca „undită” moleculară pentru a marca acele colonii care poartă ADN corespunzător, de care rămîn legate prin hibridare, fapt care poate fi evidențiat prin autoradiografie, deoarece impresionează emulsia fotografică. ARNm se leagă specific de gena corespunzătoare, chiar dacă aceasta este „îneacă” în alte sute de mii de gene diferite. Deoarece purificarea ARNm specific este dificilă și niciodată perfectă, se recurge la acest ocol suplimentar, reprezentat de producerea și clonarea într-o bacterie (pentru îmbogățire) a unui ADNc complementar față de el, care apoi se leagă de gena corespunzătoare, la fel de specific ca și ARNm (Kóurilsky, 1980).

Tehnicile din această categorie folosesc ca „sondă” fragmente de ARNm marcate radioactiv sau de ADNc, lungi de 14 — 18 nucleotide, cu secvență identică sau foarte apropiată de unele regiuni ale ADN căutat (Tolstosher și Lecocq, 1984). Pentru identificarea coloniilor bacteriene care poartă o plasmidă cu ADNc specific se aplică o folie de nitroceluloză pe suprafața mediului de cultură, în așa fel încît atunci cînd aceasta este ridicată unele celule din fiecare colonie sînt luate pe filtru, iar altele rămîn pe placă. Aranjarea coloniilor pe placă și pe filtru este identică. Filtrul de nitroceluloză este tratat cu NaOH, care lizează bacteriile și denaturează ADN. După uscarea filtrelor în vid, ele sînt tratate cu ADNc marcat cu ³²P. Moleculele „sondă” se vor hibrida cu secvențele omologe din structura plasmidei recombinante, fapt evidențiat prin autoradiografie. Colo-

nia bacteriană transformată este recoltată, stabilindu-i poziția în placa Petri, prin comparație cu cea de pe discul de nitroceluloză.

O variantă a acestei tehnici folosește ARNm marcat cu ^{32}P . După hibridare, ARNm este eluat, concentrat și adăugat unui sistem acelar de sinteză proteică. Proteina rezultată este caracterizată pe baza funcției și/sau proprietăților sale moleculare. În cazul în care vehiculul molecular este un fag, se induce liza celulelor bacteriene cu ajutorul radiațiilor UV și se ia „amprenta” plajelor de liză și respectiv a ADN eliberat din celule în mod asemănător pe un disc de nitroceluloză, care este supus hibridării cu o „sondă” radioactivă.

În sfârșit, rezultate interesante furnizează evidențierea și identificarea segmentelor de ADN străin încorporate, spre exemplu, în plasmidele himere prin analiza regiunilor heteroduplex cu ajutorul microelectronografiei.

Metodele imunochimice

O altă modalitate de a identifica și izola celulele care poartă clone de ADNc specific eucariot este capacitatea de a produce proteinele funcționale corespunzătoare în *E. coli*. Pentru a simplifica evidențierea acestora se folosesc anticorpi față de proteina respectivă marcați radioactiv. Coloniile formate din bacterii care produc proteina dorită leagă anticorpii marcați și pot fi identificate prin autoradiografie. Tehnica este utilă în special în cazurile în care secvența aminoacizilor în proteina respectivă este necunoscută.

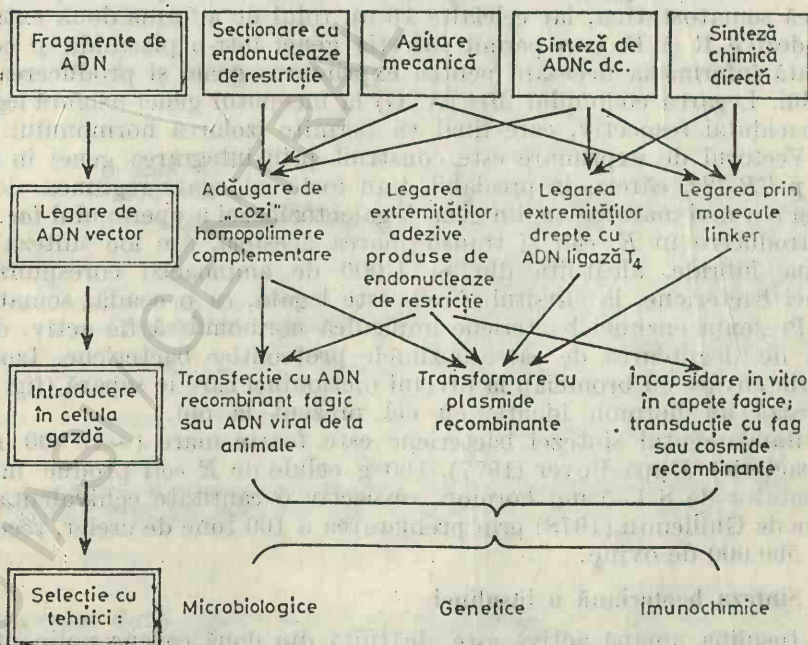


Fig. 346. — Schema generală a strategiilor utilizabile în clonarea ADN. Săgețile marchează căile de elecție în diferite situații (după Old și Primerose, 1980).

Din cele prezentate rezultă că tehnologia ADN recombinant dispune în prezent de procedee și strategii multiple. Opțiunea pentru unele sau altele decurge din natura obiectivului propus, proveniența, mărimea, puritatea materialului de plecare și natura structurii sale moleculare. Fig. 346 prezintă sintetic diferitele etape și posibilitățile de realizare. Exemplele următoare ilustrează modul în care diferitele procedee pot fi alese în funcție de obiectivul dorit.

Aplicații practice și realizări ale tehnologiei ADN recombinant

Sinteza bacteriană a somatostatinei

Primul hormon uman produs de celulele bacteriene a fost somatostatina, sintetizată normal în hipotalamus, de unde este transportată prin intermediul singelui în hipofiză. Ea are acțiune inhibitoare asupra hormonului de creștere, controlând tulburările de creștere de tipul acromegaliei, inhibă eliberarea de glucagon și de insulină, participând la reglarea concentrației lor în organism.

Somatostatina este un polipeptid alcătuit din 14 aminoacizi, a căror secvență este cunoscută, fapt care a permis sinteza genei pe cale chimică, *in vitro*, sub forma a 8 oligonucleotide m.c. Reunirea fragmentelor într-o genă funcțională, în ordine corectă, a fost posibilă deoarece conțineau secvențe complementare suprapuse. Din cele 52 pb. conținute, 42 codifică somatostatina, iar celelalte 10 au rolul de a forma două extremități adezive R și B, care permit inserția genei într-o plasmidă și conțin totodată informația necesară pentru exprimarea genei și producerea hormonului. Legarea codonului *Met* (ATG) la începutul genei asigură legarea aminoacidului respectiv, care final va permite izolarea hormonului.

Vectorul de exprimare este construit prin integrarea genei în plasmida *p BR 322*, căreia, în prealabil, i-au fost adăugate regiunea de reglare și cea mai mare parte din gena β -galactozidazei a operonului *lac*. După introducerea în *E. coli* și transformarea acesteia, are loc sinteza unei proteine hibride, alcătuită din ~ 1 000 de aminoacizi corespunzători enzimei bacteriene, la sfârșitul căreia este legată, ca o coadă, somatostatina. Prezența enzimei bacteriene împiedică hormonul să fie activ, dar îl apără de degradarea de către enzimele proteolitice bacteriene. Izolarea lor, prin clivare cu bromician la nivelul metioninei care le separă (fig. 347), eliberează un hormon identic cu cel prezent la om.

Randamentul sintezei bacteriene este foarte mare (~10 000 molecule/bacterie). După Boyer (1977), 100 g celule de *E. coli* produc într-un fermentator de 8 l, 5 mg hormon, respectiv o cantitate echivalentă celei izolate de Guillemin (1978) prin prelucrarea a 100 tone de creier, recoltate de la 500 000 de ovine.

Sinteza bacteriană a insulinei

Insulina umană activă este alcătuită din două catene polipeptidice A și B, reunite prin legături disulfidice între atomii de S ai cisteinei. Produsul primar al genei cromosomale este o moleculă de ARNm-preproinsu-

lină, alcătuită din 327 nucleotide, care este tradusă în pancreas la un peptid lung de 109 aminoacizi — format dintr-o secvență semnal (23 aminoacizi) și segmentele A (21 aminoacizi), B (30 aminoacizi) și C (bucă de conec-

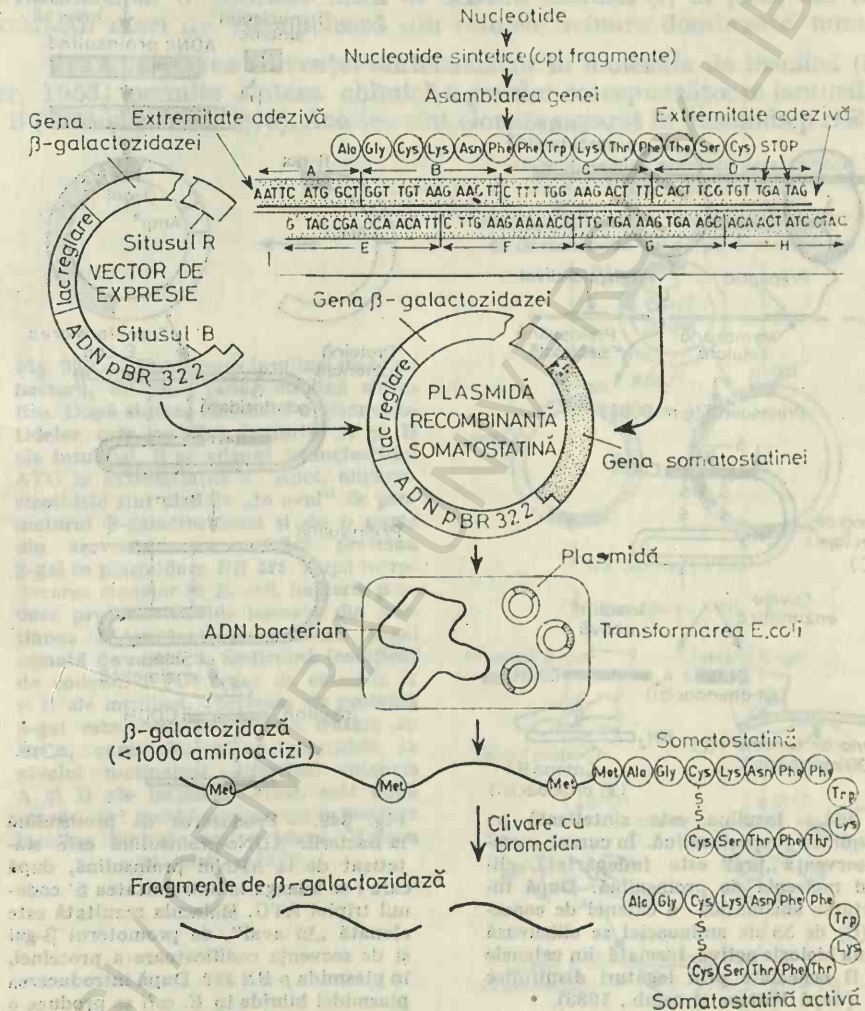


Fig. 347. — Reprezentarea schematică a principalelor etape de sinteză a somatostatinei după clonarea genei sintetice respective în *E. coli* (după Aharonowitz și Cohen, 1981).

țare a celor două catene, de 35 de aminoacizi). Deci structura preproinsulinei este NH_2 —(prepeptid)-catena B-(peptid C)-catena A— COOH (fig. 348). În cursul transportului, peptidul-semnal este clivat de restul moleculei,

care este stocată în celulele pancreasului, în vezicule legate de membrane, sub formă de proinsulină. Aceasta este convertită la insulină activă prin îndepărtarea peptidului C și stocată ca sare cristalină de Zn, gata de a fi

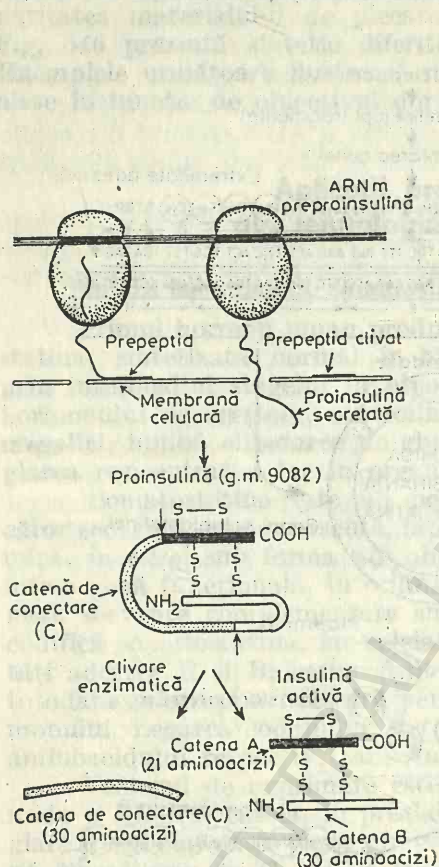


Fig. 348. — Insulina este sintetizată pe ribosomi ca preproinsulină. În cursul secreției, secvența „pre” este îndepărtată, eliberând molecula de proinsulină. După îndepărtarea enzimatică a catenei de conectare (C) de 33 de aminoacizi se eliberează insulina biologic activă, formată din catenele A și B conectate prin legături disulfidice (după Watson și colab., 1983).

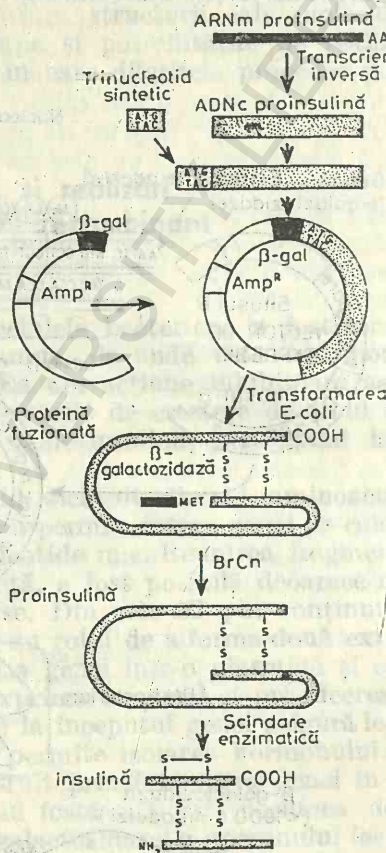


Fig. 349. — Producerea de proinsulină la bacterii. ADNc-proinsulină este sintetizat de la ARNm proinsulină, după care i se adaugă la extremitatea 5' codonul triplet ATG. Molecula rezultată este clonată „în aval”, de promotorul β -gal și de secvența codificatoare a proteinei, în plasmida p BR 322. După introducerea plasmidei hibride în *E. coli* se produce o proteină de fuziune β -gal-proinsulină. Aminoacizii β -gal sint îndepărtați prin tratare cu BrCN. Proinsulina rezultată este tratată enzimatic pentru a obține insulina biologic activă (după Watson și colab., 1983).

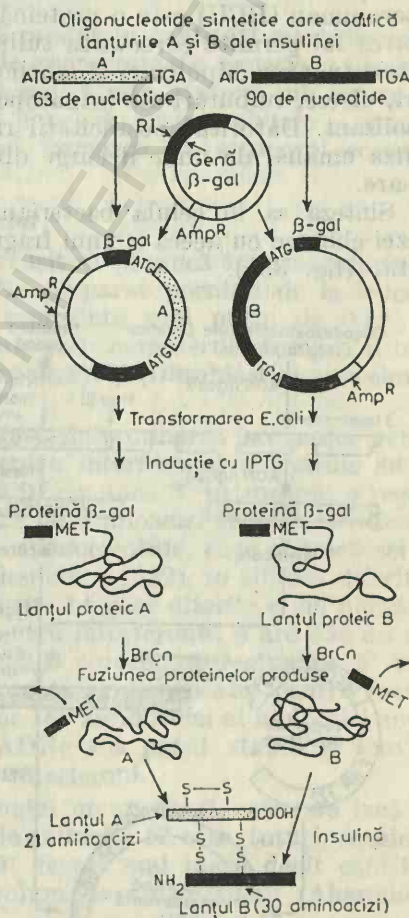
„exportată”. Datorită acestei structuri complexe, precum și faptului că are o secvență necodificatoare intercalată, gena naturală nu poate fi folosită în experiențele de ingineria genelor.

Pentru obținerea genei utilizate în clonare s-a recurs la două căi:

1) Sinteza de ADNc utilizând ARNm-insulină, cu ajutorul transcriptazei inverse, izolată din virusul mieloblastozei aviare (fig. 349). Tehnica este dificilă deoarece celulele endocrine B care produc insulină în pancreas formează doar o cantitate mică de ARNm insulină și, în plus, din cauza cantității mari de ribonuclează din celulele acinare dominante numeric.

2) Cunoașterea secvenței aminoacizilor în molecula de insulină (Sanger, 1953) permite sinteza chimică a genelor corespunzătoare lanțurilor A și B (Crea și colab., 1978). Acestea sînt clonate separat în plasmida *p BR 322*,

Fig. 350. — Producerea insulinei de către bacterii, utilizînd genele-insulină sintetice. După sinteza chimică a oligonucleotidelor care codifică lanțurile A și B ale insulinei, li se adaugă trinucleotidul ATG la extremitățile 5'. Apoi, oligonucleotidele sînt clonate „în aval” de promotorul β -galactozidazei și de o parte din secvența care codifică proteina β -gal în plasmida *p BR 322*. După introducerea clonelor în *E. coli*, bacteria produce proteine hibride formate din porțiunea N-terminală a proteinei β -gal urmată de restul de metionină (codificat de codonul ATG) legat de catenele A și B ale insulinei. Porțiunea de proteină β -gal este îndepărtată prin tratare cu BrCn, care clivează polipeptidele la nivelul metioninei, eliberînd catenele A și B ale insulinei. Final, cele două catene sînt combinate pentru a produce insulina biologic activă (după Watson și colab., 1983).



în aval față de promotorul operonului *lac* și de o parte din gena β -galactozidazei (operonul *lac*) și introduse în *E. coli*, prin transformare indusă (fig. 350).

Se obțin două tipuri de bacterii himere, care, după inducția cu izopropil- β -D-tiogalactozid (IPTC), produc proteine-hibride diferite: una sintetizează catena A a insulinei, legată de porțiunea N-terminală a

β -galactozidazei bacteriene prin aminoacidul Met (codon ATG); și alta, corespunzând catenei B, legată în același mod. După separarea lor de proteina bacteriană cu bromcian, care clivează la nivelul Met, și purificare, catenele A și B sînt reunite prin oxidarea grupărilor sulfhidril ale resturilor de cisteină, pentru a forma insulina activă.

Randamentul sintezei este de $\sim 10^5$ molecule/bacterie (Goeddel, 1979).

Sinteza bacteriană a hormonului de creștere uman

Produs în mod normal în celulele lobului anterior al hipofizei, în care se găsește în cantitate foarte mică (4–6 mg/hipofiză), hormonul de creștere uman (HCU) este o proteină alcătuită din 191 aminoacizi. Administrarea lui permite corectarea tulburărilor de creștere ale copilor hipopituitari (nanism hipofizar) și ameliorarea în alte afecțiuni (pseudartroze, arsuri, ulcere, tulburări ale hematopoeziei etc.), la care se adaugă un efect anabolizant. Datorită specificității riguroase, singura sursă naturală este hipofiza umană, de unde decurge dificultatea de a-l obține în cantitățile necesare.

Sinteza sa în celula bacteriană a fost asigurată prin combinarea sintezei chimice cu aceea a unui fragment de ADNc, produs de la ARNm pituitar (fig. 351).

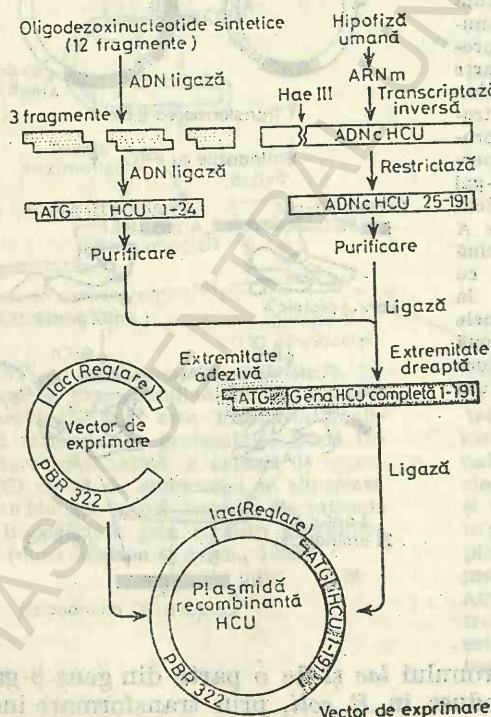


Fig. 351. — Reprezentarea schematică a tehnologiei utilizate în sinteza hormonului de creștere uman, prin combinarea sintezei chimice cu izolarea genei naturale (după Aharonowitz și Cohen, 1981).

Primul fragment „adaptor”, sintetizat chimic inițial, sub forma a trei fragmente, conține informația pentru aminoacizii 1–24 ai hormonului și, în plus, codonul inițiator ATG. Cel de-al doilea a fost produs de

la ARNm (izolat de preferință din tumori hipofizare, ale unor bolnavi de acromegalie), cu ajutorul transcriptazei inverse. ADNc rezultat este tratat cu restrictaza *Hae III*, care clivează secvențele inițiale exact înaintea codonului pentru aminoacidul 25 al HCU. Cele două fragmente sînt clonate separat, pentru a fi replicate și corectate, după care sînt purificate și legate pentru a reconstitui gena completă (1—191) a HCU, căreia i s-au adăugat, pe lîngă codonul inițiator ATG, un semnal-stop. După clonare în plasmida *p BR 322*, în aval de promotorul *lac*, plasmida recombinantă rezultată (*p HCU 107*) este introdusă în *E. coli*, care produce un HCU, avînd o metionină în plus, dar care, în rest (ca și în activitatea biologică), este identic cu cel uman.

Pe lîngă avantajul de a putea fi produs în cantități mari, în culturi continue, HCU sintetizat de bacteriile reprogramate genetic este chimic pur, liber de virusuri și omogen (în hipofiză este prezent sub forma unei populații de molecule heterogene din punct de vedere chimic și, de aici, riscul de a produce hipersensibilizări și formarea de anticorpi corespunzători).

Sinteza bacteriană a interferonilor

Gilbert și Weissman (1980) au reușit să producă interferon prin clonarea în plasmida *p BR 322* a ADNc preparat pornind de la leucocite umane, deși ARNm corespunzător reprezintă mai puțin de 0,1% din ARN total. Dificultăți majore sînt legate și de caracterul eterogen al interferonilor, care, pe lîngă tipurile α (leucocitar), β (fibroblastic) și γ (imun), include o serie de subtipururi.

De o importanță deosebită a fost determinarea secvenței genelor pentru interferonii α și β . ARNm pentru interferonul α conține 865 de ribonucleotide, dintre care 242 sîntuate în regiunea 3' netradusă, o regiune de 69 de ribonucleotide, care codifică 23 de aminoacizi ce asigură transportul prin membrane, și alta de 498 de ribonucleotide, care codifică cei 166 de aminoacizi ai moleculei. După Weissmann (1982), în sinteza diferitelor tipuri de interferon α uman ar fi implicate 14 gene diferite și un număr de pseudogene (gene inactive). ARNm pentru interferonul β are 836 de ribonucleotide, dintre care 72, respectiv 203 corespund regiunilor 5' și 3', care nu sînt traduse, 63 codifică un peptid indispensabil pentru secreția proteinei, iar 498 dirijează sinteza celor 166 aminoacizi ai moleculei active. Utilizînd secvența nucleotidelor în ADNc s-a putut stabili și secvența aminoacizilor în diferitele tipuri de interferoni.

Randamentul sintezei interferonului uman în *E. coli* este încă mic (600 μ g interferon leucocitar/l mediu de cultură). El este, totuși, considerat ca important, deoarece este de 1000 de ori mai mare decît cantitatea obținută din prelucrarea aceluiași volum de sînge uman (Aharonowitz și Cohen, 1981).

Obținerea de noi bacterii fixatoare de azot molecular

Unul dintre primele obiective ale cercetărilor de ingineria genelor a fost cel de creare de noi bacterii fixatoare de N_2 , prin transferul operonului *nif* (nitrogen fixation) de la bacteriile care au această proprietate la alte microorganisme din sol. Descoperit simultan la *Klebsiella pneumo-*

niae de Streicher, precum și de Dixon și Postgate (1971), acest operon codifică formarea sistemului enzimatic esențial al nitrogenazei. Ulterior, Streicher, Curney și Valentine (1978) au demonstrat posibilitatea transferului genelor *nif* de la *K. pneumoniae* la *E. coli*, prin transducție cu fagul P1, precum și posibilitatea funcționării acestor gene ca și în gazda din care provin. În sfârșit, Dixon și Postgate (1978) au descris prezența genelor *nif* în structura unor plasmide și posibilitatea transmiterii lor prin conjugare la *E. coli*.

Dacă transferul operonului *nif* (care codifică 17 proteine) este relativ ușor de realizat cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant, funcționarea lui îndelungată în bacteriile receptoare ridică o serie de probleme legate de necesitatea de a transfera, concomitent genele care specifică anumiți transportori de electroni, cofactori esențiali pentru funcționarea nitrogenazei și pentru protecția ei față de acțiunea inhibitoare a O_2 . Pentru protecția sistemului enzimatic nitrogenazic, bacteriile fixatoare de N_2 și-au creat, în cursul evoluției, bariere anatomice și mecanisme biochimice complexe, de excludere a O_2 liber, a căror implantare în bacteriile receptoare este practic imposibilă. De aceea, realizarea acestui obiectiv deosebit de important evoluează, în special, în sensul creării de noi asociații și interacțiuni ecologice între noile bacterii fixatoare de N și celulele sau organismele vegetale.

Producerea de „superbacterii” care utilizează hidrocarburile

Capacitatea unor bacterii din genul *Pseudomonas* de a degrada și asimila anumite tipuri de hidrocarburi este codificată de gene localizate pe plasmide. Pornind de la această observație, Chakrabarty (1978) a constituit, prin recombinări succesive, o superbacterie (superbug), prin cumulara în aceeași bacterie — *Pseudomonas putida* — a patru plasmide: *Oct* (care codifică metabolizarea hidrocarburilor octanice, hexanice și decanice), *Xyl* (pentru xilen și toluen), *Cam* (camfor) și *Nah* (naftaleni). Plasmidele *Cam* și *Nah* au funcție de conjugoni. Final, *Ps. putida* conține trei plasmide *Xyl*, *Nah* și o plasmidă hibridă, derivată din combinarea unor părți din plasmidele *Cam* și *Oct* care fiind incompatibile nu pot coexista separat în aceeași bacterie.

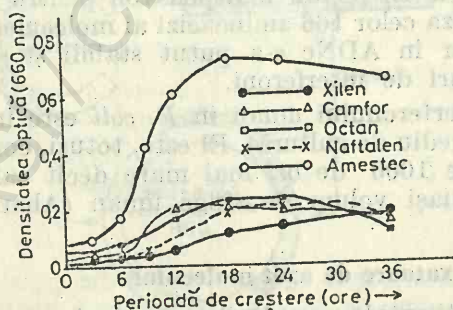


Fig. 352. — Creșterea bacteriei multiplasmidice *Pseudomonas aeruginosa* în prezența unor concentrații suboptimale (2,5 mM) de diferite hidrocarburi. Amestecul conține 2,5 mM din fiecare hidrocarbură (după Chakrabarty, 1978).

Bacteria multiplasmidică se dezvoltă mai bine și mai rapid pe țigeti pur, pe măsură ce numărul proceselor de degradare efectuate sub acțiunea plasmidelor crește cantitativ și ca varietate (fig. 352).

În prezent, se depun eforturi pentru diversificarea tipurilor de plasmide capabile să degradeze și alte categorii de hidrocarburi. Tulpinile astfel constituite au două utilizări practice potențiale: 1) debarasarea țițeiului brut de diferite hidrocarburi ciclice, aromatice sau policiclice înainte de utilizarea lui pentru producerea de drojdii furajere; 2) combaterea „marcelor negre” determinate de deversarea accidentală în mări și oceane a unor mari cantități de țiței din vase. Răspindite din avion, bacteriile multiplasmidice proliferază rapid și transformă țițeiul în proteine asimilabile de zooplancton, realizând depoluarea marină și transformarea hidrocarburilor în hrană pentru fauna marină.

Transferul materialului genetic la plante cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant

Până în prezent au fost propuse mai multe tehnici de introducere a ADN străin în celulele sau în organismul plantelor, ca, de exemplu, înglobarea directă a ADN, microinjecția, utilizarea vectorilor virali din grupul *Caulimovirus* (virusul mozaicului conopidei, Caplan, 1983).

Interacțiunea *Agrobacterium* — celula vegetală și transferul de informație tumorigenă prin intermediul plasmidei Ti reprezintă primul exemplu al unui sistem natural de transfer de gene de la procariote la eucariote (Roy Dixon, 1978). Acest sistem furnizează un instrument util pentru a depăși barierele biologice dintre cele două categorii de organisme, facilitând introducerea genelor procariote în plantele superioare, cu condiția de a fi în prealabil inserate în plasmida Ti.

Tehnica are avantaje deosebite, decurgând din capacitatea *A. tumefaciens* de a avea un spectru larg de gazde (infectează practic toate plantele dicotiledonate), din capacitatea ADN integrat în cromosomul celulelor vegetale de a se transmite mendelian la descendenți și de faptul că genele sale au promotori proprii, de care pot fi cuplate și genele străine.

Ținând seama de dificultățile creării de bacterii fixatoare de N_2 eficiente, s-a propus transferul operonului *nif*, inserat în plasmida Ti, direct la plantele superioare, prin intermediul *A. tumefaciens*, pentru a le face fixatoare de N_2 (fig. 353). Tehnica propusă în acest scop implică „scoaterea” regiunii T din structura plasmidei Ti și inserția ei într-un vehicul de clonare cunoscut, plasmida *p BR 322*. După clonare, pentru replicare în *E. coli*, plasmida hibridă (*p BR 322 + T(Tc)*) este reizolată și folosită pentru a insera genele străine eucariote provenite dintr-o celulă vegetală într-o regiune neesențială a ei. Se obține o altă plasmidă hibridă (*p BR 322 + T(Tc) + gena de la plante*), care este și ea multiplicată în *E. coli*, reizolată și introdusă într-o populație de *A. tumefaciens*, care conține plasmida Ti normală. În aceste condiții are loc un proces de recombinare genetică omologă, între ADNT din plasmidele Ti normale și ADNT clonat în plasmida hibridă, care conține genele străine. În cursul acestui proces ADNT din plasmida hibridă se substituie celui din plasmida Ti normală. Rezultă o tulpină de *Agrobacterium*, care conține o plasmidă Ti cu o regiune T, de care este legată gena străină. Infectând plantele sensibile prin intermediul unor leziuni minime, bacteria modificată genetic transferă genele străine noului organism vegetal gazdă.

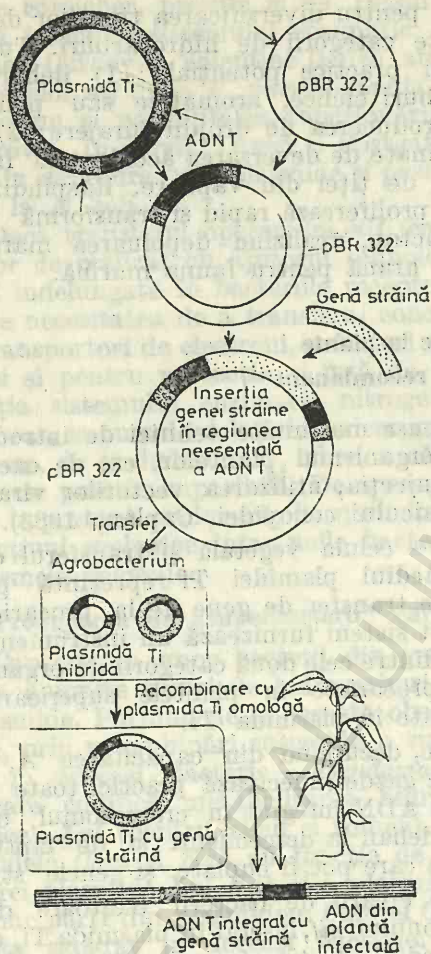


Fig. 353. — Procedeu de utilizare a plasmidei *Ti* ca vector. ADN T plasmidial este clivat cu restric-taze și clonat în plasmida *p BR 322*. Gena străină dintr-o celulă vegetală este inserată în regiunea ADN T clonată în *p BR 322*. Plasmida hibridă rezultată este pusă în contact cu *A. tumefaciens*, care conține plasmide *Ti* normale. ADN T al acestora se recombina cu cel al plasmidei hibride, pentru a forma plasmide *Ti* hibride, care poartă gena străină. *Agrobacterium*, care poartă gena străină, este folosit pentru a infecta plantele, ce încorporează ADN T modificat în cromosomii lor (după Watson și colab., 1983).

În ultimii ani au fost propuse și alte strategii, mai sofisticate, de introducere a bacteriei *A. tumefaciens* purtătoare de plasmide recombinante în plante (fig. 354). Ele pot utiliza pentru clonare celule cultivate în suspensie, protoplaști vegetali, celule regenerare din protoplaști, precum și bacterii modificate, în sensul suprimării proprietăților lor oncogene, cu menținerea infecțiozității (Cocking și colab., 1981).

În vederea combaterii insectelor dăunătoare, Kirschbaum (1985) preconizează că pornind de la *Bacillus thuringiensis* și alte bacterii similare să se creeze, prin tehnici de inginerie a genelor, toxine foarte active și cu un spectru foarte larg de activitate pentru insectele dăunătoare. Genele modificate ar putea fi transmise direct la plante, cu ajutorul plasmidei *Ti*, pentru a le face rezistente la dăunători. Nivelul de exprimare a genei ar putea fi atât de ridicat, încât insectele care se hrănesc pe resutu-

rile plantei ar consuma o doză letală de toxină, fără ca planta să prezinte modificări patologice.

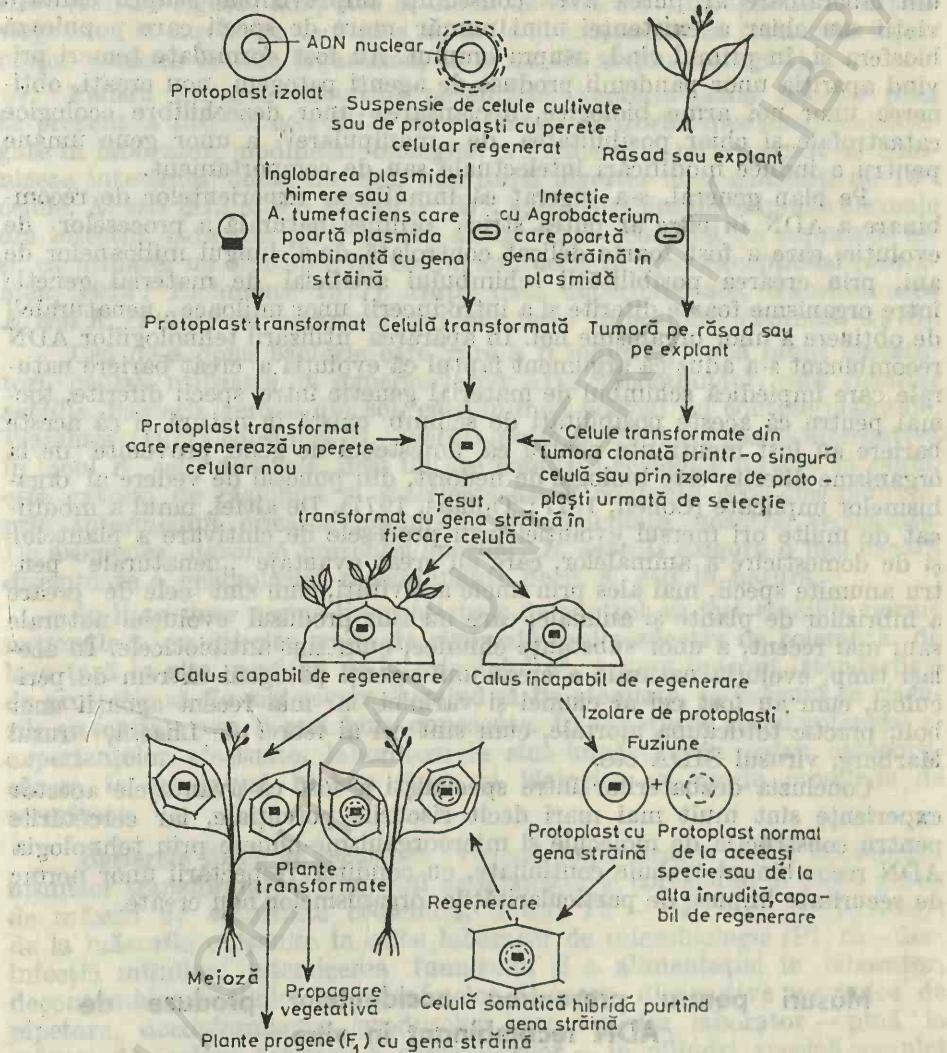


Fig. 354. — Strategiile de transformare a plantelor superioare cu *Agrobacterium*, utilizând plasmide recombinante și protoplasti vegetali izolați, culturi de celule, protoplasti cu peretele celular regenerat, răsaduri sau explante (după Cocking și colab., 1981).

Riscurile potențiale ale experiențelor de recombinare a ADN in vitro

După efectuarea primelor experiențe bazate pe tehnologia ADN recombinant, numeroși cercetători și oameni de stat au emis rezerve privind riscurile potențiale legate de obținerea unor microorganisme-himere,

foarte virulente sau purtătoare de gene nocive (gene de rezistență la antibiotice, gene oncogene etc.), a căror eliberare necontrolată sau deliberată din laboratoare ar putea avea consecințe imprevizibile asupra calității vieții sau chiar a existenței unui număr mare de specii care populează biosfera și, în primul rînd, asupra omului. Au fost formulate temeri privind apariția unor pandemii produse de agenți patogeni nou creați, obținerea unor noi arme biologice, declanșarea unor dezechilibre ecologice catastrofale și chiar posibilitatea de „manipulare” a unor gene umane pentru a induce modificări intelectuale sau de comportament.

Pe plan general, s-a sugerat că înmulțirea experiențelor de recombinare a ADN *in vitro* ar putea strica ordinea naturală a proceselor de evoluție, care a fost foarte delicat controlată de-a lungul milioane de ani, prin crearea posibilității schimbului artificial de material genetic între organisme foarte diferite și a introducerii unor mijloace „nenaturale” de obținere a unor organisme noi. În apărarea utilizării tehnologiilor ADN recombinant s-a adus ca argument faptul că evoluția a creat bariere naturale care împiedică schimbul de material genetic între specii diferite, tocmai pentru că aceste posibilități de schimb există în natură și că aceste bariere au fost menținute pentru că amestecul de gene provenite de la organisme diferite este biologic de nedorit, din punctul de vedere al organismelor implicate (Cohen, 1977; Tiollais, 1977). De altfel, omul a modificat de multe ori mersul evoluției prin procesele de cultivare a plantelor și de domesticire a animalelor, care au creat avantaje „nenaturale” pentru anumite specii, mai ales prin unele activități, cum sînt cele de creare a hibrizilor de plante și animale, care nu sînt produsul evoluției naturale sau, mai recent, a unor substanțe chimice, cum sînt antibioticele. În același timp, evoluția naturală a creat unii agenți patogeni extrem de periculoși, cum au fost cei ai ciumei și variolei, iar mai recent agenții unor boli, practic totdeauna mortale, cum sînt cei ai febrei de Lhassa, virusul Marburg, virusul SIDA etc.

Concluzia dezbatărilor între specialiști a fost că avantajele acestor experiențe sînt mult mai mari decît riscurile potențiale, iar cercetările pentru construcția de molecule și microorganisme-himere prin tehnologia ADN recombinant trebuie continuate, cu condiția respectării unor norme de securitate impuse de particularitățile organismelor nou create.

Măsuri pentru prevenirea accidentelor produse de ADN recombinant *in vitro*

După expresia lui Cohen (1977), tehnicile de ADN recombinant, ca și substanțele chimice dintr-un laborator nu sînt nici bune, nici rele, *per se*. Unele experiențe (ca și unele combinații de substanțe chimice) pot fi periculoase, altele inofensive. Există și o a treia categorie, corespunzînd unei zone intermediare, în care riscurile nu sînt legate de consecințe așteptate, ci de posibilități ipotetice și speculative.

Pentru prevenirea accidentelor se recomandă ca, în general, în tehnicile de ADN recombinant cu potențial ridicat de pericolozitate să se utilizeze fie vehiculi de clonare „dificili” (fagi și plasmide netransmisibile,

care nu se pot replica în alte gazde diferite de bacteria-receptoare sau care omoară alte gazde imediat după ce le infectează), fie bacterii-gazdă „dificile” (tulpini riguros adaptate la medii de laborator, incapabile să supraviețuiască în nișele lor ecologice normale și incapabile să transmită informația genetică la alte organisme, în orice alt mediu s-ar găsi).

Pentru evitarea riscurilor potențiale, bacteria-gazdă folosită până în prezent a fost *E. coli* K12, care a suferit, datorită menținerii îndelungate în laborator, modificări biologice profunde care nu îi permit să coloneze intestinul uman normal, nici după ingestia unei cantități de 10^{11} celule. *E. coli* K12 este o variantă „R”, spre deosebire de tulpinile normale din intestin, care sînt „S”, poartă antigen „O” complet pe suprafața lor și, ca urmare, nu sînt apte de conjugare, decît în mod excepțional (Jarolmen, 1972; Richmons, 1977). După date experimentale, transformarea *E. coli* K 12 într-un organism patogen este imposibilă (Formal, 1978).

Cea de-a doua bacterie care pare a fi indicată, după mulți cercetători, pentru utilizarea în experiențe cu ADN recombinant, este *Bacillus subtilis*, bacterie aerobă din sol, care în mod normal nu conține plasmide. Warshaw (1977) consideră *B. subtilis* puțin potrivit ca gazdă alternativă în locul *E. coli*, deoarece, deși nu are contacte ecologice directe cu omul, este extrem de răspîndit și stabilește astfel contacte ecologice indirecte, prin intermediul oricăror organisme din imediata noastră vecinătate. De asemenea, datorită prezenței sporilor, *B. subtilis* asigură o mai ușoară diseminare a genomurilor recombinante decît *E. coli* în natură.

În lipsa unor norme internaționale de control au fost stabilite norme naționale*, cu diferite grade de rigurozitate și respectiv de toleranță, de la o țară la alta, pornind de la principiul că, pentru început, standardele de protecție să fie mai severe, urmînd să fie atenuate, pe măsură ce riscurile potențiale vor fi mai bine cunoscute. În funcție de riscul potențial al experiențelor efectuate, laboratoarele sînt împărțite în patru categorii, cărora le corespund bariere fizice și biologice cu grade crescînde de securitate.

Barierile fizice de securitate vizează împiedicarea ieșirii microorganismelor transformate din mediul de laborator și corespund la patru grade de măsuri de securitate crescîndă, notate P1 — P4 (engl. = Physical); de la măsurile obișnuite în orice laborator de microbiologie (P1) ca — dezinfectia mîinilor, interzicerea fumatului și a alimentației în laborator, decontaminarea zilnică a suprafețelor de lucru, dispozitive mecanice de pipetare, decontaminarea produselor care ies din laborator — pînă la măsuri de izolare perfectă a cercetătorilor — în cilindri speciali complet separați, cu pereți, tavane și podele monolitice, construite din material neporos, cu instalații de canalizare și circuite electrice perfect izolate, aer sterilizat, ventilație cu depresiune atmosferică, căi de acces cu ecluze pneumatice, haine de protecție, instalații proprii de sterilizare a reziduurilor și îmbrăcăminții etc. (P4).

* Derivate, în general, din normele Institutului Național de Sănătate din S.U.A. („Guidelines of National Institute of Health”), sînt considerate de mulți cercetători, ca o soluție de compromis între temeri și dorințe (Roberts, 1979).

Barierile biologice de securitate au ca scop reducerea la maximum a riscului de propagare în afara laboratorului a microorganismului transformat prin tehnologia ADN recombinant. Ele sînt stabilite în raport cu *E. coli* K12.

Pentru experimentele care implică un risc mic (EK-1), se admite utilizarea ca microorganism-gazdă a *E. coli* K12, datorită capacității sale reduse de a coloniza tubul digestiv uman, în concurență cu tulpinile sălbatice.

În experimentele cu risc mai mare (EK-2), se recomandă utilizarea unor microorganisme receptoare mai vulnerabile, cum ar fi mutantele χ (Chi)-1776 ale *E. coli* K12 (Roy Curtis III, 1976), care prezintă 15 mutații genice și, decurgînd din aceasta, o foarte mare dependență de mediul de laborator (dependență absolută de acidul diaminopimelic, intermediar în biosinteza lizinei, avînd drept consecință prezența unui perete celular extrem de fragil la concentrații saline mici și la urme de detergenți) și ca urmare incapacitatea de a supraviețui în mediul natural. Aceste tulpini sînt distruse de lumina solară, antibiotice și săruri biliare, cresc pe medii cu substanțe neobișnuite în natură, iar în cursul tranzitului prin tubul digestiv supraviețuiește cel mult o celulă din 100 milioane.

În sfîrșit, pentru experimentele cu risc foarte mare (EK-3), se vor folosi numai microorganisme verificate îndelung ca inapte să trăiască în mediul natural. Acestea sînt bacterii mutante, incapabile să sintetizeze bazele nucleice necesare pentru formarea ADN sau a constituenților pereților celulari, care nu pot utiliza glucidele sau care nu se dezvoltă la 37° și nici sub 32°C, sensibile la U.V. și incapabile să primească gene, inclusiv fagi de la alte organisme.

Sînt interzise toate tipurile de experiențe pentru care există argumente științifice în sensul unui risc grav, chiar potențial. Experiențele cu unele virusuri animale se fac numai în laboratoare cu nivelul de protecție P4.

O categorie de experiențe care prezintă un grad foarte ridicat de nesiguranță și de risc (deși prezintă unele avantaje legate de posibilitatea de a cerceta sistemele genetice complexe ale organismelor superioare) sînt experiențele cunoscute sub denumirea de experiențe „shotgun” (engl. shotgun = pușcă de vîntătoare cu alicie), în care ADN total al unui organism este expus acțiunii mai multor enzime de restricție și secționat „orbește” pentru a obține cit mai multe fragmente de ADN. Acestea sînt recombinate cu un vector adecvat și moleculele-himere rezultate sînt grefate la întîmplare în celule de *E. coli*, care sînt diseminate pe suprafața unei medii de cultură solidificat. În felul acesta, fiecare celulă bacteriană care conține cite o secvență străină de ADN dă naștere unei colonii, iar în ansamblul coloniilor dezvoltate pe suprafața mediului de cultură se vor regăsi toate secvențele care formau genomul inițial, grefate la întîmplare. Experiențele „shotgun” sînt mult mai periculoase decît cele cu ADN purificat, deoarece ele prezintă pericolul ca anumite frîgmente de ADN cu funcții necunoscute sau represate să se poată replica și să determine urmări foarte grave. De aceea, ele nu pot fi efectuate decît în laboratoare special echipate, care asigură un grad ridicat de protecție.

Perspectivile tehnologiei ADN recombinant

Încercările de a extinde limitele hibridării prin metode neconvenționale au rămas fără succes, deoarece schimbul de informație genetică între specii îndepărtate este restrins de incompatibilități sau de sterilitatea descendenților obținuți. Recombinarea genetică a moleculelor de ADN *in vitro* nu este supusă restricțiilor taxonomice. Ca urmare, materialul genetic provenit de la organisme cu origini foarte diferite, cu omologii foarte mici, poate fi legat într-un vector corespunzător și introdus într-o celulă-gazdă pentru propagare și exprimare. În felul acesta au fost create noi combinații genetice, prin clonarea ADN de la organismele superioare în celulele bacteriene.

Odată cu dezvoltarea ingineriei genelor s-a profilat o nouă orientare în evoluția științelor biologice, marcată de apariția *ingineriei biologice* cunoscută și sub denumiri ca *geniu biologic*, *ingineria microorganismelor* („microbial engineering”) sau *bichimică* („biochemical engineering”). Acest domeniu, născut din convergența microbiologiei și geneticii microorganismelor cu biochimia acizilor nucleici și enzimologia, cu imunochimia și tehnicile de culturi celulare *in vitro*, stă la baza revoluției biindustriale sau biotehnologice cu mari aplicații în medicină, farmacie, chimie, agricultură, alimentație, industrie, producerea de energie etc. Aplicațiile tehnicilor de ingineria genelor pot fi grupate convențional în mai multe categorii :

1) Modificarea genetică a microorganismelor industriale în scopul creșterii productivității lor prin : a) combinarea într-o singură celulă bacteriană a posibilității de sinteză a două sau mai multe produse diferite ; b) obținerea unor microorganisme capabile să facă hipersinteza unui compus (enzimă, proteină alimentară, hormon etc.). Acest obiectiv se poate realiza fie prin amplificarea numărului plasmidelor (până la câteva sute) într-o celulă, fie prin înlocuirea unui promotor „lent” cu un promotor „rapid”, care asigură o transcriere mai rapidă a operonului respectiv ; c) producerea unor antibiotice noi, modificate, rezistente la acțiunea enzimelor inactivante sau a unor antibiotice hibride, cu spectru larg de acțiune, prin utilizarea unor plasmide hibride ce controlează anumite părți din căile biosintetice ale unor antibiotice asemănătoare.

2) Transferul unor gene animale în celulele bacteriene pentru a asigura producerea unor proteine specifice (hormoni), a căror sinteză chimică este greu sau încă imposibil de realizat, sau a căror izolare din organele și țesuturile naturale este dificilă.

3) Modificarea genetică a unor plante superioare în vederea creșterii producției, a rezistenței la condiții nefavorabile de mediu, a conținutului în substanțe nutritive și în calorii.

4) Obținerea unor bacterii reprogramate genetic cu rol în depoluarea mediului și conversia poluanților în proteine nutritive (prin degradarea hidrocarburilor, a reziduurilor industriale etc.), precum și prin biodegradarea pesticidelor, detergenților, maselor plastice etc.

5) Transformarea genetică a unor celule somatice în vederea corectării unor defecte genetice ca, de exemplu, anemia falciformă („sickle cell anemia”), fenilcetonuria etc. (Beers, 1977).

Lederberg (1980) a dat denumirea de „biofori” microorganismelor industriale ideale, în care a fost „cusut” material genetic străin capabil să codifice producerea optimă a unui compus. Biotehnologiile viitorului vizează crearea unor colecții de astfel de „biofori”, fiecare în parte „croit” pentru un obiectiv specific, în funcție de natura produsului și procesului util urmărit, precum și pe baza unor considerente de economicitate și de securitate.

După Freeland-Judson (1984), deși comentariile menite să popularizeze cuceririle ingineriei genelor reliefează în special foloasele practice pe care le promite utilizarea acestei tehnologii, adevărul este că importanța ei pentru cercetările fundamentale este incomparabil mai mare. Ea a permis analiza structurii detaliate a unui număr mare de gene euca-riote, stabilirea relației între structura și funcția genei, producerea de ADN cu secvențe cunoscute în stare absolut pură, perfecționarea tehnicilor de identificare a moleculelor de ADN etc. Aceste rezultate justifică opinia lui Old și Primerose (1980) după care, cea mai mare contribuție adusă de cercetarea ADN recombinant a fost, fără îndoială, la însuși domeniul bio-logiciei moleculare.

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE

Carta veche

Prețulu

Cuub

75

Bibliografie selectivă

- ACHTMAN, M., 1975, *Mating aggregates in Escherichia coli conjugation*. J. Bacteriol., **123**, 505—515.
- ACHTMAN, M., 1978, *Cell-cell interactions in bacterial conjugations*. In: *Transport of macromolecules in cellular systems* (Silverstein S. C. ed.), Life Sciences Research Report 11. Dahlem Konferenzen, Berlin.
- ADELBERG, E. A., PITTARD, J., 1965, *Chromosome transfer in bacterial conjugation*. Bacteriol. Rev., **29**, 161—172.
- ALBERTS, B., SHERNGLANZ, R., 1977, *Recent excitement in the DNA replication problem*. Nature (Londra), **269**, 655—661.
- ALFÖLDI, L., 1982, *Fusion of microbiol protoplasts: problems and perspectives*. In: *Genetic engineering of microorganisms for chemicals* (Hollaender, A. și colab., eds.), Plenum Publ. Corp., p. 59—71.
- ALIKHANIAN, S. I., 1979, *Achievements of genetic engineering and their bacterial applications*. Biol. Zentralbl. Band., **98**, 513—526.
- ALLDRICK, A. J., SMITH, J. T., 1983, *R-plasmid effects on bacterial multiplication and survival*. Ant. Leeuwenhoek, **49**, 133—142.
- AMES, B. N., 1979, *Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer*. Science, **204**, 587—593.
- ANAGOSTOPOULOS, C., 1968, *Récents développements dans le domaine de la transformation bactérienne*. Bull. Soc. Chim. Biol., **50**, 275—291.
- ANDERSON, W. F., DIACUMAKOS, E. G., 1981, *Genetic Engineering in mammalian cells*. Sci. Amer., **245**, 60—93.
- ANGHEL, I., BREZEANU A., TOMA N., 1981, *Ultrastructura celulei vegetale*. Atlas, Edit. Academiei, București.
- ANGHEL, I., HERLEA, V., TOMA, N., 1984, *Drojdiiile*, Edit. Academiei, București.
- ANTOHI, S., GAVRILĂ, L., 1981, *Progrese in genetica moleculară*, Edit. științifică și enciclopedică, București.
- ARBER, W., 1977, *What is the function of DNA restriction enzymes*, Trends. Biochem. Sci., **8**, 176—178.
- ARBER, W., 1979, *Promotion and limitation of genetic exchange*, Science, **205**, 361—365.
- AVERY, O. T., MACLEOD, C. M., MCCARTY, M., 1944, *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III*. J. Exp. Med., **79**, 137—158.
- AVITABILE, M., BARCELLONA, M. L., MASOTTI, L., 1981, *Optical rotation and DNA conformation in eucaryota and procaryota*. Microbiologica, **4**, 441—491.
- BACHMANN, B. J., LOW, K. B., 1980, *Linkage map of Escherichia coli K-12*, ed. a 6-a, Microbiol. Rev., **44**, 1—56.
- BAILONE, A., LEVINE, A., DEVORET, R., 1979, *Inactivation of prophage lambda repressor in vivo*. J. Mol. Biol., **131**, 553—572.
- BALTIMORE, D., 1970, *Viral RNA-dependent DNA polymerase*. Nature, **226**, 1205—1211.
- BARON, L. S., GEMSKI, P. Jr., JOHNSON, E. M., WOHLHIETER, J. A., 1968, *Intergeneric bacterial matings*. Bacteriol. Rev., **32**, 362—396.
- BARRE, L. L. B. C., AIR, G. M., HUTCHINSON III C. A., 1976, *Overlapping genes in bacteriophage Φ X 174*. Nature (Londra), **264**, 34—40.

- BEALE, G. H., KNOWLES, J. K. C., 1978, *Extranuclear genetics*. Edw. Arnold Ltd., New York.
- BEARDSLEY, R. E., 1972, *The inception phase in the crown gall disease*. Progress Experim. Tumor Res., 15, 1-75.
- BECKWITH, J. R., GALIZZI, A., SMITH, G. R., 1985, *The tools of bacterial genetics*. In: *Genetics of bacteria*. Acad. Press, Londra, p. 1-23.
- BEDBROOK, J. R., LEHRACH, H., AUSUBEL, F. M., 1979, *Directive segregation is the basis of Col E 1 plasmids incompatibility*. Nature (Londra), 281, 447-450.
- BEERS, JR. R. F., BASSET, E. G., 1977, *Recombinant molecules impact on science and society*, Raven Press, New York.
- BENZER, S., 1962, *The fine structure of the gene*. In: *The molecular basis of life. An introduction to molecular biology*. W. H. Freeman & Co., San Francisco - Londra.
- BENZINGER R., 1978, *Transfection of Enterobacteriaceae and its applications*. Microbiol. Rev., 42, 194-236.
- BERG, P., 1981, *Dissections and reconstructions of genes and chromosomes*. Science (Londra), 213, 296-303.
- BERNSTEIN, C., 1981, *Deoxyribonucleic acid repair in bacteriophage*. Microbiol. Rev., 45, 1-98.
- BIRGE, E. A., 1981, *Bacterial and bacteriophage genetics. An introduction*, Springer-Verlag, New York.
- BLACK, S., 1973, *A theory on the origin of life*. In: *Advances in Enzymology*, vol. 38 (Meister, A. ed.), John Wiley & Sons Inc., New York, p. 193-234.
- BLEECKEN, S., 1971, *"Replisome"-controlled initiation of DNA replication*. J. theor. Biol., 32, 81-92.
- BODMER, W. F., 1970, *The evolutionary significance of recombination in prokaryotes*. Symposium of the Society for General Microbiology. XX. "Prokaryotic and eukaryotic cells", p. 279-294.
- BOSCH, L., 1972, *The mechanism of protein synthesis and its regulation*. Frontiers of biology, vol. 27, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, Londra.
- BOUBLIK, M., HELLMANN, W., KLEINSCHMIDT, A. K., 1977, *Size and structure of E. coli ribosomes by electron microscopy*. Cytobiologie. European Journal of Cell Biology, 14, 293-300.
- BRACK, C., 1981, *DNA Electron microscopy*. Critical Rev. Biochem., 10, 113-169.
- BRAINBRIDGE, B. W., 1980, *Genetics of microbes*, Blackie, Publ. Co. Glasgow-Londra.
- BRENT, R., PTASHNE, M., 1981, *Mechanism of action of the *lexA* gene product*. Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., 78, 4206-4208.
- BRESCHI, C., HAUSMANN, R., 1970, *Klassische und molekulare Genetik*. Springer-Verlag, Berlin, New York.
- BRILL, W. J., 1981, *Agricultural Microbiology*. Sci. Amer. 245: 146-154.
- BRINTON, C. C. JR., 1965, *The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in Gram-negative bacteria*, Trans. N. Y. Acad. Sci., 27, 1003-1054.
- BROACH, J. R., 1982, *The yeast plasmid 2 μ m circle*, Cell, 28: 203-204.
- BROKER, T. R., CHOW, L. T., 1980, *Patterns and consequences of adenoviral RNA splicing*. Trends. Bioch. Sci., July, p. 174-178, Elsevier, North-Holland, Biomedical Press.
- BROKER, T. R., DOERMANN, A. H., 1975, *Molecular and genetic recombination of bacteriophage T4*. Ann. Rev. Genet., 9, 213-244.
- BROOKS-LOW, K., PORTER, D. D., 1978, *Modes of Gene transfer and recombination in bacteria*. Ann. Rev. Genet., 12, 249-287.
- BROWN, D. D., 1973, *The isolation of genes*. Sci. Amer., 229, 21-29.
- BROWN, D. D., 1981, *Gene expression in eukaryotes*. Science, 211, 667-674.
- CAIRNS, J., 1963, *The chromosome of Escherichia coli*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 28, 43-46.
- CALHOUN, K., HATFIELD, G. W., 1975, *Autoregulation of gene expression*. Ann. Rev. Microbiol., 29, 275-299.
- CALOS, M. P., MILLER, J. H., 1980, *Transposable elements*. Cell, 20, 579-595.
- CAMPBELL, A., 1964, *Transduction*. In: *The Bacteria* (Gunsalus, I. C., Stanier, R. Y., eds.), Academic Press, New York.
- CAMPBELL, A., 1981, *Evolutionary Significance of accessory DNA elements in bacteria*, Ann. Rev. Microbiol., 35, 55-83.
- CAMPBELL, A., BENEDIK, M., HEFFERNAN, L., 1979, *Viruses and inserting elements in chromosomal evolution*. In: *Concepts on the structure and function of DNA, chromatin and chromosomes* (Dion, A.S., ed.), Year Book Medical Publ., Chicago, p. 51-79.
- CAMPBELL, A., BERG, P. E., LEDERBERG, E. M., STARLINGER, P., BÖTSTEIN, D., NOVICK, R. P.,

- SZYBALSKI, W., 1979, *Nomenclature of transposable elements in prokaryotes*. Plasmid., **2**, 466—473.
- CAPE, R. E., *Microbial genetics and the pharmaceutical industry*. 1979, Chemtech., Oct., 638—644.
- CAPLAN, A., HERRERA-ESTRELLA, L., INZE, D., VAN HAUTE, E., VAN MONTAGU, M., SCHEL, J., ZAMBRYSKI, P., 1983, *Introduction of genetic material into plant cells*. Science (S.U.A.), **222**, 815—821.
- CARROLL, D., ADJOKA, R. S., 1980, *Recombination of a eukaryotic DNA in bacteria*. Gene, **20**, 273—281.
- CECH, T. R., 1983, *RNA splicing: three themes with variations*. Cell., **34**, 713—716.
- CHAKRABARTY, A. M. (ed.), 1981, *Genetic engineering*. CRC Press Inc., Palm. Beach, S.U.A.
- CHAMON, P., 1981, *Split genes*. Sci. Amer. **245**.
- CHAPEVILLE, F., HAENNI, A. L., 1974, *Biosynthèse des protéines. Traduction génétique*. Hermann, Paris.
- CHARRIER, R., GUILLEN, N., FLEURY, A. M., LE HAGART, T., HIRSCHBEIN, L., 1980, *Organisation of the isolated Bacillus subtilis nucleoid*. Biologie cellulaire, **38**, 105—114.
- CLARK, A. J., 1971, *Pathways of genetic recombination in bacteria*. In: *Recent advances in microbiology*. X. "International congress for Microbiology", Mexico, p. 257—265.
- CLARK, A. J., 1971, *Toward a metabolic interpretation of genetic recombination of E. coli and its phages*. Ann. Rev. Microbiol., **25**, 438—463.
- CLARK, A. J., ADELBERG, E. A., 1972, *Bacterial conjugation*. Ann. Rev. Microbiol., **16**, 289—319.
- CLARKE, C. H., SHANKEL, D. M., 1975, *Antimutagenesis in microbial systems*. Bacteriol. Rev., **39**, 33—53.
- CLARK, A. J., WARREN, G. J., 1979, *Conjugal transmission of plasmids*. Ann. Rev. Genetics, **13**, 99—125.
- CLEWELL, D. B., 1981, *Plasmids, drug resistance and gene transfer in the genus Streptococcus*. Microbiol. Rev., **45**, 409—436.
- GLOWES, R. C., 1972, *Molecular structure of bacterial plasmids*. Bacteriol. Rev., **36**, 361—405.
- GLOWES, R. C., 1973, *The molecule of infectious drug resistance*. Sci. Amer., **228**, 19—27.
- COCKING, E. C., DAVEY, M. R., PENTAL, D., POWER, J. B., 1981, *Aspects of plant genetic manipulation*. Nature, **293**, 265—270.
- COHEN, G., 1976, *Microorganismes et biologie moléculaire*. Hermann, Paris.
- COHEN, S. N., 1976, *Transposable genetic elements and plasmid evolution*. Nature, **263**, 731—738.
- COHEN, S. N., 1979, *The transplantation and manipulation of genes in microorganisms*. The Harvey Lectures, Series 74, p. 173—204.
- COHEN, S. N., SHAPIRO, J. A., 1982, *Transposable genetic elements*. Sci. Amer., **247**: 36—45.
- COHEN, S. N., SILVER, R. P., SHARP, P. A., MCCOUBREY, A. E., 1971, *Studies on the molecular nature of R factors*. Ann. N.Y. Acad. Sci., **182**, 172—187.
- COLLINS, J., HOHN, B., 1978, *Cosmids: type of plasmid gene cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **75**, 4242—4246.
- COLLINS, J., MAYER, H., 1980, *Restriction endonucleases or the site-specific DNA endonucleases*. Arzneimittelforsch., **30**, (1) 541—547.
- COOPER, P. K., HAMAWALT, P. C., 1972, *Role of DNA polymerase I in the rec system in excision-repair in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **69**, 1156—1160.
- CORNELIS, G., 1982, *Les transposons et séquences d'insertion*. Bull. Inst. Pasteur, **80**, 3—60.
- COZARELLI, N. R., 1980, *DNA Topoisomerases*. Cell., **22**, 324—328.
- CRICK, F. H. C., 1958, *On protein synthesis*. Symp. Soc. Exptl. Biol., **12**, 138—163.
- CRICK, F. H. C., 1968, *The origin of the genetic code*. J. Mol. Biol., **38**, 367—379.
- CRICK, F. H. C., 1970, *Central dogma of molecular Biology*. Nature, **227**, 561—563.
- CRICK, F. H. C., 1974, *The double helix: a personal view*. Nature (Londra), **248**, 766—769.
- CROCKETT, G. C., 1983, *The chemical synthesis of DNA*. Aldrichimica Acta., **16**, 47—55.
- CURTISS, III R., 1969, *Bacterial Conjugation*. Ann. Rev. Microbiol., **23**, 69—136.
- CURTISS, III R., 1976, *Genetic manipulation of microorganisms: potential. Benefits and biohazards*. Bacteriol. Rev., **30**, 507—533.
- CURTISS, III R., CHARAMELLA, L. J., STALLIONS, D. R., MAYS, J. A., 1968, *Parental functions during conjugation in Escherichia coli K 12*. Bacteriol. Rev., **32**, 320—348.
- DAUNE, M., 1978, *Changements de conformation du DNA modifié par des agents chimiques*. Biochimie, **60**, 1097—1110.

- DAVERN, C. I., 1971, *Molecular aspects of genetic recombination*. In: *Progress in nucleic acid research*, **11**, 229–258, Academic Press Inc., New-York–Londra.
- DAVIDSON, J. N., 1972, *The biochemistry of the nucleic acids*. Chapman and Hall Science paperback.
- DAVIS, B. D., 1961, *The teleonomic significance of biosynthetic control mechanisms*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **XXVI**, 1–10.
- DE GRAAF, F. K., 1979, *Mode of action of colicin E₂, colicin E₃ and Cloacin DF 13*. Zbl. Bakt. Hyg. 1 Abt Orig. A., **244**, 121–134.
- DELIUS, H., WORCEL, A., 1973, *Electron microscopic studies on the folded chromosome of Escherichia coli*. Cold Spring Harbor. Symposia on Quantitative Biology, **XXXVIII**, 53–58.
- DELIUS, H., WORCEL, A., 1974, *Electron microscopic visualization of the folded chromosome of Escherichia coli*. J. Mol. Biol., **82**, 107–109.
- DEMPLE, B., LINN, S., 1980, *DNA N-glycosylases and UV repair*. Nature (Londra) **283**, 203–208.
- DE ROBERTIS, E. M., GURDON, J. B., 1979, *Gene transplantation and the analysis of development*. Sci. Amer., **241**, 66–76.
- DEVORET, R., 1978, *Inducible error-prone repair: one of the cellular responses to DNA damage*. Biochimie, **60**, 1135–1140.
- DEVORET, R., 1979, *Bacterial tests for potential carcinogens*. Sci. Amer., **241**, 28–37.
- DOI, H. R., 1977, *Role of ribonucleic acid polymerase in gene selection in procaryotes*. Bacteriol. Rev., **41**, 568–594.
- DOOLITTLE, FORD, W., SAPIENZA, C., 1980, *Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution*. Nature, **284**, 601–603.
- DRAKE, J. W., 1974, *The role of mutation in microbial evolution*. In: Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge Univ. Press., **24**, 41–58.
- DRAKE, J. W., GLICKMAN, B. W., RIPLEY, L. S., 1983, *Updating the theory of Mutation*. Amer. Sci., **71**, 621–630.
- DRESSLER, D., POTTER, H., 1982, *Molecular mechanisms in genetic recombination*. Ann. Rev. Biochem., **51**, 727–761.
- DRLICA, K. A., KADO, C. I., 1975, *Crown gall tumors: are bacterial nucleic acids involved*. Bacteriol. Rev., **39**, 186–196.
- DRUMMOND, M., 1979, *Crown gall disease*. Nature (Londra), **281**, 343–347.
- DUFTON, M. J., 1983, *The significance of redundancy in the genetic code*. J. theor. Biol., **102**, 521–526.
- DULBECCO, R., 1979, *Contribution of microbiology to eucaryotic cell biology*. New Direction for microbiology. Microbiol. Rev., **43**, 443–552.
- DUNCAN, C. H., WILSON, G. A., YOUNG, F. E., 1978, *Mechanisms of integration of foreign DNA during transformation of Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **75**, 3664–3668.
- DUNNY, G., BROWN, B., CLEWELL, D. B., 1978, *Induced cell aggregation and mating in Streptococcus faecalis. Evidence for a bacterial sex pheromone*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **75**, 3479–3483.
- DUNNY, G., CREIG, R., CARRON, R., CLEWELL, D. B., 1979, *Plasmid transfer in Streptococcus faecalis. Production of multiple sex-pheromones by recipients*. Plasmid., **29**, 454–465.
- ECHOLS, H., MURIALDO, H., 1978, *Genetic map of bacteriophage Lambda*. Microbiol. Rev., **42**, 577–590.
- EIGEN, M., GARDINER, W., SCHUSTER, P., WINKLER-OSWATISCH, R., 1981, *The origin of genetic information*. Sci. Amer., **244**, 78–94.
- EISENSTARK, A., 1977, *Genetic recombination in bacteria*. Ann. Rev. Genet., **11**, 369–396.
- ELWELL, L. P., SHIPLEY, P. L., 1980, *Plasmid mediated factors associated with virulence of bacteria to animals*. Ann. Rev. Microbiol., **34**, 465–496.
- ENGELMAN, D. M., MOORE, P. B., 1976, *Neutron-scattering studies of the ribosome*. Sci. Amer., **235**, 44–54.
- FERENCZY, L., 1981, *Microbial protoplast fusion*. XXXI Symposium of the Society for general microbiology. "Genetics as a tool in microbiology", Cambridge Univ. Press., p. 1–35.
- FERSHT, A. R., 1981, *Enzymic editing mechanisms and the genetic code*. Proc. R. Soc. Lond., **B 212**, 351–379.
- FIDDES, J. C., 1977, *The nucleotide sequence of a viral DNA*. Sci. Amer., **237**, 55–67.
- FLANDERS, P. H., 1981, *Inducible repair of DNA*. Sci. Amer., **245**, 56–64.

- FODOR, K., ALFÖLDY, L., 1976, *Fusion of protoplasts of Bacillus megaterium*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **73**, 2147—2150.
- FODOR, K., ROSTÁS, K., ALFÖLDY, L., 1979, *Bacterial protoplasts and their possible use in bacterial genetics*. Advances in protoplast research, **22**, 19—27.
- FONG, P., 1967, *Packing of the DNA molecule*. J. Theoret. Biol., **15**, 230—235.
- FOSTER, T. J., 1983, *Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria*. Microbiol. Rev., **47**, 361—409.
- FOX, M. S., 1978, *Some features of genetic recombination in procaryotes*. Ann. Rev. Genet., **12**, 47—68.
- FOX, S. F., 1974, *Origins of biological information and the genetic code*. Molecular and cellular biochemistry, **3**, 129—142.
- FRAENKEL-CONRAT, H., WILLIAMS, R. C., 1955, *Reconstitution of tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **41**, 690—698.
- FRASER, T. H., 1980, *The future of recombinant DNA technology in medicine*. In: Perspectives in biology and medicine, **23**, 499—512.
- FRÉDÉRICQ, P., 1963, *Colicines et autres bactériocines*. Ergebn. Mikrobiol. Immunitätsforsch. Experim. Therap., **37**, 114—161.
- GALAS, D. J., CHANDLER, M., 1981, *On the molecular mechanism of transposition*. Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.); 4858—4862.
- GALLO, R. C., 1973, *Reverse transcriptase and neoplasia*. Biomedicine, **18**, 446—452.
- GARBER, E. D., ESPOSITO, M. S., 1977, *Defining the gene by mutation, recombination and function*. In: Cell Biology. Vol. I. Genetic mechanisms of cells, Garber, E. D., Esposito, M. S. (eds.), Academic Press, New York.
- GAVRILĂ, L., DĂBALĂ, I., 1975, *Genetica diviziunii celulare*, Edit. Dacia, Cluj-Napoca.
- GAVRILĂ, L., DĂBALĂ, I., 1981, *Descifrind tainele eredității*, vol. I, II, Edit. Dacia, Cluj-Napoca.
- GAVRILĂ, L., MIHĂESCU, G., 1982, *Mutagenesis in blue-green algae (Cyanobacteria) and some evolutionary considerations*. Caryologia, **35**, 11—22.
- GELLERT, M., MIZUUCHI, K., O'DEA, M. H., OHMORI, H., TOMIZAWA, I., 1979, *DNA gyrase and DNA supercoiling*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **XLIII**, 35—40.
- GENETELLO, C., VAN LAREBEKE, N., HOLSTERS, M., DEPICKER, A., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., 1977, *Ti-plasmids of Agrobacterium as conjugative plasmids*. Nature (Londra), **265**, 561—563.
- GIERER, A., SCHRAMM, G. S., 1956, *Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus*. Nature (Londra), **177**, 702—703.
- GILBERT, W., 1985, *Genes -in pieces revisited*, Science, **228**, 823—824.
- GINGERAS, T. R., ROBERTS, R. J., 1980, *Steps toward computer analysis of nucleotide sequences*. Science (Londra), **209**, 1322—1328.
- GIRARD, M., HIRTH, L., 1980, *Virologie générale et moléculaire*. Doin, Paris.
- GOLDBERGER, R. F., 1974, *Autogenous regulation of gene expression*. Science, **183**, 810—816.
- GOLDSTEIN, L., PRESCOTT, D. M., 1977, *Cell biology*. Vol. 1, Genetic mechanisms of cells. Academic Press, New York.
- GOLDSTEIN, L., PRESCOTT, D. M., 1980, *Cell biology Gene expression: the production of RNA's*. Vol. 3, Academic Press, New York.
- GOODENOUGH, V., LEVING, R. P., 1974, *Genetics*. Holt, Rinehart & Winston Inc., New York.
- GOTS, J. S., BENSON, C. E., 1974, *Biochemical genetics of bacteria*. Ann. Rev. Genetics, **8**, 79—101.
- GOTTESMAN, M. E., 1974, *The integration and excision of bacteriophage Lambda*. Cell, **1**, 69—72.
- GOTTESMAN, S., 1981, *Genetic control of the SOS system in E. coli*. Cell., **23**, 1—2.
- GOTTSCHALK, G., 1979, *Bacterial metabolism*. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
- GOTTSCHALK, W., 1978, *Allgemeine Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- GRAGEROV, A. I., MIRKIN, C. M., 1980, *Vlicanie sverhspralizatti DNK na osnovnie gheneticskie protect prokariot*. Molekulearnaa biologhlea, **14**, 8—34.
- GREEN, M. H. L., 1978, *Mechanisms of bacterial mutagenesis and properties of mutagenesis tester strains*. Arch. Toxicol., **39**, 241—248.
- GRIFFITH, F., 1928, *The significance of pneumococcal types*. J. Hyg. Cambridge, **27**, 113—121.
- GRINIUS, L., 1980, *Nucleic acid transport driven by ion gradient across cell membrane*, FEBS Letters, **113**, 1—10.
- GROBSTEIN, C., 1977, *The recombinant-DNA debate*. Sci. Amer., **137**, 22—33.
- GROS, F., CONTESSE, G., 1972, *Etude des mécanismes de régulation positive au niveau de la transcription*. Biochimie, **54**, 551—558.

- GROS, F., GRUNBERG-MANAGO, M., 1974, *Biosynthèse des acides nucléiques. Réplication et transcription*. Hermann, Paris.
- GROSS, J. D., CARO, L. G., 1966, DNA transfer in bacterial conjugation. *J. Mol. Biol.*, **16**, 269—284.
- GROSSMAN, L., 1981, Enzymes involved in the repair of damaged DNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **211**, 511—522.
- GUARENTE, L., ROBERTS, T. M., PRASHNE, M., 1980, A technique for expression eukaryotic genes in bacteria. *Science*, **209**, 1428—1430.
- GUERRIER-TAKADA, C., ALTMAN, S., 1984, Catalytic activity of an ARN molecule prepared by transcription *in vitro*. *Science*, **223**, 285—286.
- GÜNTHER, E., 1984, *Lehrbuch der Genetik*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- HAHN, F. E., 1973, Reverse transcription and the Central dogma. In *Progress in molecular and subcellular biology*, **3**, 1—13, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- HAHN, F. E., 1979, *Chemotherapy of bacterial plasmids*. Naturwissensch., **66**, 555—562.
- HALL, B. G., YOKOYAMA, S., CALHOUN, D. H., 1983, Role of cryptic genes in microbial evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **1**, 109—124.
- HAMKALO, B. A., MILLER, O. D. Jr., 1973, Electron microscopy of genetic activity. *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 379—396.
- HAMKALO, B. A., MILLER, O. L. Jr., 1973, Visualization of genetic transcription. In: *Gene expression and its regulation* (Kenney, F. T., Hamkalo, B. A., Favclukes, G., August, J. T., eds.), Plenum Publ. Co., New York, p. 63—74.
- HAMON, Y., 1964, Les bactériocines. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, **107**, 18—53.
- HAMON, Y., 1965, Les bactériocines et substances analogues. *Path. Biol.*, **13**, 806—824.
- HANAWALT, P. C., 1972, Repair of genetic material in living cells. *Endeavour*, **31**, 83—88.
- HANAWALT, P. C., 1975, Molecular mechanisms involved in DNA repair. *Genetics*, **79**, 179—197.
- HANAWALT, P. C., HAYNES, R. H., 1967, The repair of DNA. *Sci Amer.*, **216**, 36—43.
- HARDY, K. G., 1975, Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.*, **39**, 464—515.
- HAYES, W., 1966, Genetic transformation: a retrospective appreciation. *J. Gen. Microbiol.*, **45**, 385—397.
- HAYES, W., 1968, *The genetics of bacteria and their viruses*, ed. a 2-a, J. Willey & Sons, New York.
- HAYES, W., 1980, Portraits of viruses: bacteriophage lambda. *Intervirology*, **13**, 133—153.
- HEFFERMAN, L., BENEDIK, M., CAMPBELL, A., 1979, Regulatory structure of the insertion region of bacteriophage λ . *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **43**, 1124—1134.
- HELINSKI, D. R., 1973, Plasmid determined resistance to antibiotics: Molecular properties of R factors. *Ann. Rev. Microbiol.*, **27**, 437—470.
- HELINSKI, D. R., 1979, Bacterial plasmids: autonomous replication and vehicles for gene cloning. *CRC. Critical Rev. Biochem.*, **83**—101.
- HELMUTH, R., ACHTMAN, M., 1975, Operon structure of DNA transfer cistrons on the F sex factor. *Nature (Londra)*, **257**, 652—656.
- HELMUTH, R., ACHTMAN, M., 1978, Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: purification of F pili with biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 1237—1241.
- HERDMAN, M., JANVIER, M., RIPPKA, R., STANIER, R. Y., 1979, Genome size of *Cyanobacteria*. *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 73—85.
- HERSHEY, A. D., CHASE, M., 1952, Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.*, **36**, 39—54.
- HERSKOWITZ, I., 1973, Control of gene expression in bacteriophage Lambda. *Ann. Rev. Genetics*, **7**, 289—324.
- HERSKOWITZ, I. H., 1977, *Principles of genetics*, ed. a 2-a, MacMillan Publ. Co. Inc., New York.
- HEYN, R. F., RÖRSCH, A., SCHILPERROORT, R. A., 1974, *Quant. Rev. Biophysics*, **7**, 35—73.
- HIGERD, T. B., BAECHLER, C. A., BERK, R. S., 1967, In vitro and in vivo characterization of Pyocin. *J. Bacteriol.*, **93**, 1976—1986.
- HIGERD, T. S., BAECHLER, C. H., BERK, R. S., 1969, Morphological studies on relaxed and contracted forms of purified pyocin particles. *J. Bacteriol.*, **93**, 1378—1389.
- HOHN, B., COLLINS, Y., 1980, A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene*, **11**, 291—298.
- HOLLAND, I. B., 1979, Penetration of the bacterial envelope by colicins. *Zbt. Bakt. Hyg., I. Abt.-Orig. A*, **22**, 74—77.

- HOLLENBERG, C. P., 1980, *Recombination. Recombinant DNA Research. An update of techniques and results*. Progress in botany (Ellenberg, H. și colab., eds.) Springer Verlag, Berlin, New York.
- HOLLENDER, A., BURRI, S. R. H. (eds.), *Biological Engineering for nitrogen fixation*. Plenum Press, New York, Londra.
- HOLLOWAY, B. W., 1979, *Plasmids that mobilize bacterial chromosome*. *Plasmid.*, **2**, 1—19.
- HOPWOOD, D. A., 1981, *The genetic programming of industrial microorganisms*. *Sci. Amer.* **245** : 67—78.
- HOPWOOD, D. A., 1978, *Extrachromosomally determined antibiotic production*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 373—392.
- HOPWOOD, D. A., MERRICK, M. J., 1977, *Genetics of antibiotic production*. *Bacteriol. Rev.*, **41**, 596—634.
- HOPWOOD, D. A., 1981, *Genetic studies with bacterial protoplasts*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 237—272.
- HÖRGEN, P. A., SILVER, C. J., 1978, *Chromatin in eukaryotic microbes*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 249—284.
- HOTCHIKISS, R. D., 1971, *Toward a general theory of genetic recombination in DNA*. *Adv. Genetics*, Academic Press Inc., New York, **16**, 325—348.
- HOTCHIKISS, R. D., 1974, *Models of genetic recombination*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **28**, 445—468.
- HOWARD-FLAUNDERS, P., 1973, *DNA-repair and recombination*. *British Medical Bull.*, **29**, 226—235.
- HOWE, M. M., BADE, E. G., 1975, *Molecular biology of bacteriophage Mu*. *Science*, **190**, 624—632.
- HUANG, P. C., 1971, *DNA, RNA and protein interaction*. In : *Progress in biophysics and molecular biology*, Pergamon Press, Oxford—New York, **23**, 103—144.
- HULL, R., DANIES, J. W., 1983, *Genetic engineering with plant viruses and their potential as vectors*. *Adv. Virus. Res.*, **28**, 1—33.
- HUNT, T., 1980, *The initiation of protein synthesis*. *Trends in Biochem. Sci.*, **5**, 178—181.
- IĂȘA, M., 1969, *The biological code*. In : *Frontiers of biology*, Vol. 12, North-Holland Publ. House, Amsterdam—Londra; American Elsevier Publ. Co. Inc., New York.
- ITAKURA, K., RIGGS, A. D., 1980, *Chemical DNA Synthesis and recombinant DNA studies*. *Science*, **209**, 1401—1405.
- JACOB, B. F., MONOD, J., 1961, *On the regulation of gene activity*. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology*, **XXVI**, 193—211.
- JACOB, F., WOLLMAN, E. L., 1961, *Sexuality and the genetics of bacteria*. *Acad. Press. Inc.*, New York.
- JONES, D., SNEATH, P. H. A., 1970, *Genetic transfer and bacterial taxonomy*. *Bacterial Rev.*, **34**, 40—81.
- JORRE, R. P., CURNOW, R. N., 1975, *The evolution of the genetic code*. *Biochimie*, **57**, 1147—1154.
- KADNER, R. J., BASSFORD, Jr. P. J., PUGSLEY, A. P., 1979, *Colicin receptors and the mechanism of colicin uptake*. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig., A* **244**, 90—104.
- KAUDEWITZ, F., 1973, *Molecular und Mikrogenetik*. Springer Verlag, New York.
- KAVENOFF, R., KLOTZ, L. C., ZIMM, B. H., 1974, *On the nature of chromosome-sized DNA molecules*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **XXXVIII**, 1—8.
- KAVENOFF, R., RYDER, O. A., 1976, *Electron microscopy of membrane-associated folded chromosomes of Escherichia coli*. *Chromosome*, **55**, 13—25.
- KERR, I. M., 1975, *Translational control of protein synthesis*. *Symposia of the Society General Microbiology*. Control processes in virus multiplication", p. 29—50.
- KIKUCHI, M., 1980, *Application of genetics for strain improvement in industrial microorganisms*. *Biotechnol. & Bioengineering*, **27**, 195—208.
- KIRSCHBAUM, J. B., 1985, *Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control*. *Ann. Rev. Entomol.*, **30**, 51—70.
- KLECKNER, N., 1977, *Translocatable elements in procaryotes*. *Cell*, **11**, 11—23.
- KLECKNER, N., 1981, *Transposable elements in prokaryotes*. *Ann. Rev. Genet.*, **15**, 341—404.
- KLINGMÜLLER, W., 1976, *Gen-manipulation und gentherapie*. Springer Verlag, Berlin.
- KNOWLER, J. T., 1882, *The processing of eukaryote mRNA*. *Biochemical Educ.*, **10** (4), 130—137.
- KOLATA, G. B., 1977, *Bacterial genetics : action at a distance on DNA*. *Science*, **198**, 41—42.
- KOLATA, G., 1983, *Z-DNA moves toward „Real biology”*. *Science (S.U.A.)*, **222**, 496—497.
- KONDO, S., 1974, *Radiation genetics in microorganisms and evolutionary considerations*. *Genetics*, **78**, 149—161.
- KONISKY, J., TOKUDA, H., 1979, *Mode of action of Colicins Ia E₁ and K*. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A*, **244**, 105—120.

- KOPECKO, D. J., 1980, *Specialized genetic recombination systems in bacteria: their involvement in gene expression and evolution*. In: *Progress in molecular and subcellular biology* (Hahn F. E. ed.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 135—140.
- KORNBERG, A., 1980, *DNA replication*. W. H. Freeman Co., San Francisco.
- KORWEK, E. J., 1981, *Recombinant DNA and the law: review of some general legal considerations*. *Gene*, **15**, 1—5.
- KOSTER, H., 1980, *Die bedeutung der chemischen Synthese von DNS für die Gentechnologie*. *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)*, **30**, 548—557.
- KUHN, B., ABDEL-MONEM, B., HOFFMANN, BERLING, H., 1979, *DNA-Helicases*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **XLIII**, 63—67.
- KUNZ, B. A., GLICKMAN, B. W., 1983, *The infidelity of conjugal DNA transfer in Escherichia coli*. *Genetics*, **105**, 489—500.
- LAGERVIST, U., 1980, *Codon misreading: a restriction operative in the evolution of the genetic code*. *Amer. Sci.*, **68**, 192—198.
- LAGERKVIST, U., 1981, *Unorthodox codon reading and the evolution of the genetic code*. *Cell*, **23**, 305—306.
- LAKE, J. A., 1976, *Ribosome structure determined by electron microscopy of Escherichia coli small subunits and monomeric ribosomes*. *J. Mol. Biol.*, **105**, 131—159.
- LAKE, J. A., 1978, *The ribosome*. *Sci. Amer.*, **238**, 56—69.
- LANDY, A., OLCHOWSKI, E., ROSS, W., 1974, *Isolation of a functional lac regulatory region*. *Molec. gen. Genet.*, **133**, 273—281.
- LAVAL, J., 1978, *Recent progress in excision repair of DNA*. *Biochimie*, **60**, 1123—1134.
- LEGATOR, M. S., FLAMM, W. G., 1973, *Environmental mutagenesis and repair*. *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 684—708.
- LEHMAN, I. R., 1974, *DNA ligase: structure, mechanism and function*. *Science*, **186**, 790—797.
- LEWIN, R., 1981, *First true RNA catalyst found*. *Science*, **223**, 266—267.
- LEWIN, R., 1982, *On the origin of introns*. *Science*, **217**, 921—922.
- LI, W. H., GOJOBORI, T., NEI, M., 1981, *Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution*. *Nature*, **292**, 237—239.
- LIPMANN, F., 1969, *Polypeptide chain elongation in protein biosynthesis*. *Science*, **164**, 1024—1031.
- LITTLE, J. W., 1982, *Control of the SOS regulatory system by the level of recA protease*. *Biochimie*, **64**, 585—589.
- LOW, K. B., 1972, *Escherichia coli K 12-F-prime factors, old and new*. *Bacteriol. Rev.*, **36**, 587—607.
- LURIA, S. E., 1970, *Phage, colicins and macroregulatory phenomena*. Les prix Nobel en 1969. The Nobel Foundation, Stockholm, p. 163—171.
- LURIA, S. E., 1973, *Life. The unfinished experiment*, Charles Scribner's Sons, New York.
- MAGRINA, F. L., 1984, *Molecular cloning of bacterial antigens and virulence determinants*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**, 193—219.
- MAGASANIK, B., 1961, *Catabolite repression*. Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology, **XXVI**, 249—256.
- MALIK, V. S., 1979, *Genetics of applied microbiology*. *Adv. Genetics*, **20**, 37—126.
- MALIK, V. S., 1980, *Recombinant DNA technology*. *Adv. Appl. Microbiol.*, **27**, 1—84.
- MANIATIS, T., PTASHNE, M., 1976, *A DNA operator-repressor system*. *Sci. Amer.*, **234**, 64—76.
- MASAHIRO, ISHIGAMI, KEY, NAGANO, 1975, *The origin of the genetic code*. *Origins of life*, **6**, 551—560.
- MAXIMILIAN, C., IOAN, D. M., 1984, *Dicționar enciclopedic de genetică*. Ed. științifică și Enciclop., București.
- MCCARTY, M., 1980, *Reminiscences of the early days of transformations*. *Ann. Rev. Genet.*, **14**, 1—15.
- McKAY, R., 1980, *Movable genes*. *Nature (Londra)*, **287**, 188—189.
- MEYNELL, E., MEYNELL, G. G., DATA, N., 1968, *Phylogenetic relationship of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids*. *Bacteriol. Rev.*, **32**, 55—83.
- MILLER, O. L. Jr., 1973, *The Visualization of genes in action*. *Sci. Amer.*, **228**, 34—42.
- MILLER, W. L., 1981, *Recombinant DNA and the pediatrician*. *The J. Pediatrics*, **99**, 1—15.
- MILLER, O. L., BEATTY, B. R., HAMKALO, B. A., THOMAS, C. A. Jr., 1970, *Electron microscopic visualization of transcription*. Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology **XXXV**, 505—512.
- MILLER, O. L., HAMKALO, B. A., 1972, *Visualization of RNA Synthesis of chromosomes*. *Int. Rev. Cytol.*, **33**, 1—25.

- MITSUHASHI, S., 1971, *Epidemiology and genetics of R factors*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **182**, 141—152.
- MOHN, G. R., 1981, *Bacterial systems for carcinogenicity testing*. Mutation Research, **87**, 191—210.
- MONOD, J., CHANGEUX, J. P., JACOB, F., 1963, *Allosteric proteins and cellular Systems*. J. Mol. Biol., **6**, 306—329.
- MONOD, J., JACOB, F., 1961, *General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation*. Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology, **XXVI**, 389—401.
- MULLIGAN, R. C., BERG, P., 1980, *Expression of a bacterial gene in mammalian cells*. Science, **209**, 1422—1427.
- NATHANS, D., 1979, *Restriction endonucleases, simian virus 40 and the new genetics*. Science, **206**, 903—909.
- NATHANS, D., SMITH, H. O., 1975, *Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules*. Ann. Rev. Biochem., **44**, 273—293.
- NEČAS, O., 1979, *Regeneration of protoplasts*. Advanced in protoplast research, **22**, 151—160.
- NESTER, E. W., KOSUGE, T., 1981, *Plasmids specifying plant hyperplasia*. Ann. Rev. Microbiol., **35**, 531—565.
- NEVERS, P., SAEDLER, H., 1977, *Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements*. Nature, **268**, 109—114.
- NIERHAUS, K. H., WITTMANN, H. G., 1980, *Ribosomal function and its inhibition by antibiotics in prokaryotes*. Naturwiss., **67**, 234—250.
- NOMURA, M., 1967, *Colicins and related bacteriocins*. Ann. Rev. Microbiol., **21**, 257—284.
- NOMURA, M., MAEDA, A., 1965, *Mechanisms of action of colicins*. Zbl. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. 1. Orig., **196**, S. 216—239.
- NOSSAL, N. G., 1983, *Prokaryotic DNA replication systems*, Ann. Rev. Biochem., **53**, 581—615.
- NOVICK, R. P., 1969, *Extrachromosomal inheritance in bacteria*. Bacteriol. Rev., **33**, 210—235.
- NOVICK, R. P., 1980, *Plasmids*. Sci. Amer. **243**, 77—90.
- NOVICK, R. P., CLOWES, R. C., COHEN, S. N., CURTIS, R. III, DATA, N., FALKOW, S., 1976, *Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal*. Bacteriol. Rev., **40**, 168—189.
- OISHI, M., COSLOY, S. D., 1974, *Specialized transformation in Escherichia coli K-12*. Nature (Londra), **248**, 112—116.
- OLBY, R., 1975, *The protein version of the central dogma: a crisis for biologists*. Genetics, **79**, 3—14.
- OLD, R. W., PRIMEROSE, S. B., 1980, *Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, Londra.
- ORGEL, L. E., 1968, *Evolution of the genetic apparatus*. J. Mol. Biol., **33**, 381—393.
- ORGEL, L. E., CRICK, F. H. C., 1980, *Selfish DNA: the ultimate parasite*. Nature, **284**, 694—697.
- OU, J. T., ANDERSON, T. F., 1970, *Role of pili in bacterial conjugation*. J. Bacteriol., **102**, 648—654.
- PACE, N. R., 1973, *Structure and synthesis of the ribosomal ribonucleic acid of prokaryotes*. Bacteriol. Rev., **37**, 562—603.
- PASTAN, I., 1972, *Cyclic AMP*. Sci. Amer., **227**, 97—105.
- PASTAN, I., PERLMAN, R., 1970, *Cyclic adenosine monophosphate in bacteria*. Science, **169**, 339—344.
- PAUL, J., 1975, *Regulation of transcription from DNA*. Symposia of the society for general Microbiology". 25th Control process in virus multiplication", p. 3—26.
- PEDERSEN, T., 1981, *Messenger RNA biosynthesis and nuclear structure*, Amer. Sci., **69**, 76—84.
- PETTITJOHN, D. E., HECHT, R., 1974, *RNA molecules bound to the folded bacterial genome stabilize DNA folds and segregate domains of supercoiling*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **XXXVIII**, p. 31—41.
- POLLOCK, M. R., 1970, *The discovery of DNA: An ironic tale of chance, prejudice and insight*. J. Gen. Microbiol., **63**, 1—20.
- POPA, L. M., REPANOVICI, R., 1982, *Tehnologia DNA recombinant*. Edit. Științifică și Enciclopedică, București.
- POSTGATE, J. R., CANNON, F. C., 1981, *The molecular and genetic manipulation of nitrogen fixation*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, **292**, 589—599.
- POTRYKUS, I., HARMS, C. T., HUTTER, R., KING, P. J., SHILLITO, R. D., 1983, *Protoplasts*, 1983, Poster Proceedings 6th International Protoplast Symposium. Experientia Supplementum, **45**, Birkhäuser Verlag, Basel.

- POTTER, H., DRESSLER, D., 1980, *DNA synaptase: an enzyme that fuses DNA molecules at a region of homology*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **77**, 2390–2394.
- PRESCOTT, D. M., GOLDSTEIN, L., 1979, *Cell biology*, Vol. 2. *The structure and replication of genetic material*. Academic Press, New York.
- PRESCOTT, D. M., GOLDSTEIN, L., 1980, *Cell Biology*, Vol. 4. *Gene expression translation and the behavior of proteins*. Academic Press, New York.
- PRICE, F. W., 1979, *Basic Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- PRIEST, F. G., 1983, *Enzyme synthesis: regulation and process of secretion in microorganisms*. In: *Microbial enzymes and biotechnology* (Fogarty, W. M. ed.), Applied Science Publ., Londra, New York.
- PÜHLER, A., 1980, *Angewandte Gentechnologie am beispiel der biologischen N₂-fixierung*, *Arztneim-Forsch. Drug. Res.*, **30**, 570–575.
- PÜHLER, A., TIMMIS, K. N., 1984, *Advanced molecular genetics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- QUILLARDET, P., HOFNUNG, M., 1984, *Induction by UV light of the SOS function SfiA in Escherichia coli strains deficient or proficient in excision repair*. *J. Bacteriol.*, **157**: 35–38.
- QUILLARDET, P., HUISMAN, O., DIARI, R., HOFNUNG, M., 1982, *SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **79**, 5971–5975.
- QUILLARDET, P., HUISMANN, O., DIARI, R., HOFNUNG, M., 1984, *The SOS chromotest: use a gene fusion to measure the genotoxicity of chemicals*. *Bull. Inst. Pasteur*, **82**, 75–82.
- RADDING, C. M., 1973, *Molecular mechanisms in genetic recombination*. *Ann. Rev. Genet.*, **7**, 87–111.
- RADDING, C. M., 1978, *Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair*. *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 847–880.
- REANNEY, D., 1976, *Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development*. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 552–590.
- REEVES, P., 1979, *The Concept of Bacteriocins*. *Zbl. Bakt. Hyg. 1 Abt. Orig. A*, **244**, 78–89.
- REZNIKOFF, W. S., 1972, *The operon revisited*. *Ann. Rev. Genetics*, **6**, 133–156.
- RICH, A., 1980, *Bits of life How information is handled in living systems*. The Sciences. The New York Academy of Sciences, p. 10–25.
- RICH, A., SUNG, HOU KIM, 1978, *The three-dimensional structure of transfer RNA*. *Sci. Amer.*, **238**, 52–62.
- RICHMOND, M. H., 1970, *Plasmids and chromosomes in prokaryotic cells*. Symposium Society for General Microbiology. XX. „Prokaryotic and eukaryotic cells”, p. 249–270.
- RICHMOND, M. H., WIEDEMAN, B., 1974, *Plasmids and bacterial evolution. Evolution in the Microbial World: 24th Symposium of the Society for General Microbiology*, p. 59–85.
- RICKENBERG, H. V., 1974, *Cyclic AMP in prokaryotes*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **28**, 353–369.
- RIEGER, P., MICHAELIS, A., GREEN, M. M., 1976, *Glossary of genetics and cytogenetics. Classical and molecular*. WEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- RILEY, M., ANILIONI, S. A., 1978, *Evolution of the bacterial genome*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 519–560.
- ROBERTS, R. J., 1977, *The role of restriction endonucleases in genetic engineering*. In: *Recombinant Molecules: Impact on Science and society*. (Beers R. F. Jr., Bassett E. G. eds.), Raven Press, New York, p. 21–32.
- ROBERTS, R. T., 1980, *Restriction and modification enzymes and their recognition sequences*. *Nucleic Acid Research*, **8**, 63–80.
- RODRIGUEZ, R. L., DALBY, M. S., DAYERN, C. I., 1973, *Autoradiographic evidence for bidirectional replication in Escherichia coli*. *J. Molec. Biol.*, **74**, 599–604.
- ROTHMAN, SCOTT, J., 1984, *Regulation of plasmid replication*. *Microbiol. Rev.*, **48**, 1–23.
- ROTHWELL, N. W., 1976, *Understanding genetics*. The Williams & Wilkins Co. New York.
- RYDER, O. A., SMITH, D. W., 1975, *Properties of membrane-associated folded to chromosomes of E. coli related to initiation and termination of DNA replication*. *Cell*, **4**, 337–345.
- SAEDLER, H., VON, 1980, *Antibiotik resistenz-Faktoren und „Springende” Gene* *Arzneimittel-forsch/Drug Res.*, **30** (I), 529–533.
- SAGAN, C., 1973, *Ultraviolet selection pressure on the earliest organisms*. *J. Theoret. Biol.*, **39**, 195–200.
- SAGAR, SETHI, V., 1971, *Structure and function of DNA-dependent RTA-polymerase*. Progress in biophysics and molecular biology. Pergamon Press, Oxford, New York, p. 69–101.

- SALISBURY, V., HEDGES, R. W., DATTA, N., 1972, *Two modes of „curing” transmissible bacterial plasmids*. J. Gen. Microbiol., **70**, 443—452.
- SASISEKHARAN, V., 1981, *Structure of DNA*. Curr. Science **50**, 107—111.
- SCHAEFFER, P., CAMI, B., HOTCHKISS, R. D., 1976, *Fusion of bacterial protoplasts*. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., **73**, 2151—2155.
- SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., 1980, *Gene transfer as an infective process*. In: *The molecular basis of microbial pathogenicity* (Smith, H., Skelhel, J. J., Turner, M. J., eds.), Weinheim Verlag Chemie GmbH, p. 225—246.
- SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., DE BEUCKELEER, M., DE BLOCK, M., DEPICKER, A., DE WILDE, M., ENGLER, G., GENETELLO, C., HERNAESTEENS, J. P., HOLTERS, M., SEURINCK, J., SILVA, B., VAN VLIET, F., VILLARROEL H., 1979, *Interactions and DNA transfer between Agrobacterium tumefaciens, the Ti-plasmid and the plant host*. Proc. Roy. Soc. Lond., **B 204**, 251—266.
- SCHLESSINGER, D., 1969, *Ribosomes: development of some current ideas*. Bacteriol. Rev., **33**, 445—453.
- SCHMITT, R., 1985, *Report on a workshop: Structure and function*. In: *Plasmids in bacteria*, Helinsky, D. R., Cohen, S. N., Clewell, D. B., Jackson D. A., Hollaender A. (eds.), Plenum Press, New York, p. 17—19.
- SCHMIDT, R., ROGOWSKY, P., 1985, *Transposable elements and evolution*. In: *Evolution of prokaryotes*, Academic Press Inc., Londra.
- SCHUTZUTZ, G., GIESECKE, K., 1980, *Organisation von genen*. Arzneimittel-Forsch (Drug. Res.), **30**, 525—529.
- SCOTT, W. A., WERNER, R. (eds.), 1977, *Molecular cloning of recombinant DNA*. Academic Press Inc., New York.
- SELANDER, R. K., LEVIN, B. R., 1980, *Genetic diversity and structure in Escherichia coli populations*. Science, **210**, 545—547.
- SETLOW, J. K., HOLLAENDER, A., 1979, *Genetic engineering Principles and methods*, Vol. 1. Plenum Press, New York, Londra.
- SHOEMAKER, N. B., GUILD, W. R., 1976, *Mismatch correction in pneumococcal transformation donor length and sex-dependent marker efficiency*. J. Bacteriol., **125**, 125—135.
- SINDIQUI, O., FOX, M. S., 1973, *Integration of donor DNA in bacterial conjugation*. J. Mol. Biol., **77**, 101—123.
- SIMON, M., ZIEG, J., SILVERMAN, M., MANDEL, G., DOOLITTLE, R., 1980, *Genes whose mission is to jump phase variation: Evolution of a controlling element*. Science, **209**, 1370—1374.
- SMITH, J. D., 1972, *Genetics of transfer RNA*. Ann. Rev. Genetics, **6**, 235—256.
- SMITH, H. Q., 1979, *Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases*. Science, **205**, 455—461.
- SOKATCH, J. R., FERRETTI, J. J., 1976, *Basic bacteriology and genetics*. Year Book Medical Publ. Inc., Chicago.
- SONEA, S., 1972, *Bacterial plasmids instrumental in the origin of Eukaryotes?* Rev. Canad. Biol., **31**, 61—63.
- SONEA, S., PANISSET, M., 1978, *L'évolution des infections bactériennes et la solidarité génétique des bactéries*. Méd. et Hyg., **36**, 2074—2081.
- SONEA, S., PANISSET, M., 1980, *Introduction à la nouvelle bactériologie*. Les presses de l'Université de Montréal, Masson.
- SPARROW, A. H., NAUMAN, A. F., 1976, *Evolution of genome size by DNA doublings*. Science, **192**, 524—529.
- SPARROW, A. H., PRICE, H. J., UNDERBRINK, A. G., 1971, *Survey of DNA content per cell and per chromosome of prokaryotic and eukaryotic organisms: some evolutionary considerations*. Brookhaven Symp. Biol., **23** "Evolution of Genetic Systems", 451—494.
- SPIZIZEN, J., REILLY, B. E., EVANS, A. H., 1966, *Microbial transformation and transfection*. Ann. Rev. Microbiol., **20**, 372—400.
- STARLINGER, P., 1977, *DNA rearrangements in prokaryotes*. Ann. Rev. Genet., **11**, 103—126.
- STARLINGER, P., 1977, *Mutations caused by the integration of IS1 and IS2 into the gal operon in DNA insertion elements, plasmids and episomes*. Cold Spring Harbor laboratory, S.U.A., p. 25—30.
- STARLINGER, P., 1980, *IS Elements and transposons*. Plasmid., **3**, 241—259.
- STARLINGER, P., SAEDLER, H., 1972, *Insertion mutations in microorganisms*. Biochimie, **54**, 177—185.
- STARLINGER, P., SAEDLER, H., 1976, *IS elements in microorganisms*. Curr. Top. Microbiol. Immunol., **75**, 111—152.

- STENT, G. S., 1971, *Molecular genetics. An introductory narrative*. Freeman W. H. & Co., San Francisco.
- STEWART, G. G., 1981, *The genetic manipulation of intestinal yeast strains*. Canad. J. Microbiol., **27**, 973–990.
- STONINGTON, O. G., PETTJOHN, D. E., 1971, *The folded genome of Escherichia coli isolated in a protein-DNA-RNA complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), **68**, 6–9.
- STOFFLER, G., STOFFLER-MEILICKE, M., 1984, *Immunoelectron microscopy of ribosomes*. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **13**, 303–330.
- STRICKBERGER, M. W., 1976, *Genetics*. ed. a 2-a, MacMillan Publ. Co. Inc., New York.
- SUSMAN, M., 1970, *General bacterial genetics*. Ann. Rev. Genetics, **4**, 135–176.
- SUSSKIND, M. M., BOTSTEIN, D., 1978, *Molecular genetics of bacteriophage P22*. Microbiol. Rev., **42**, 385–413.
- SUZUKI, A., MORI, M., SAKAGAMI, Y., ISOGAI, A., FUJINO, M., KITADA, C., CRAIG, R. A., CLEWEL, D. B., 1985, *Isolation and structure of bacterial sex pheromone*. Science, **226**, 849–850.
- SZALAY, A. A., MACKAY, C. J., LANGRIDGE, W. H. R., 1979, *Restriction endonucleases and their applications*. Enzyme. Microbiol. Technol., **1**, 154–164.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L. W., 1976, *Bacteriocins of Gram-positive bacteria*. Bacteriol. Rev., **40**, 722–756.
- TEMIN, H. M., MIZUTANI, S., 1970, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. Nature, **226**, 1211–1213.
- TOMA, N., ANGHIEL, I., 1985, *Citologie vegetală*, Edit. Universității București.
- THOMAS, B. R., 1972, *The origin of the genetic code*. Biochemical and biophysical research communications, **40**, 1289–1295.
- THOMAS, B. R., 1973, *The tRNA-mRNA complex of protein biosynthesis*. Biochimie, **55**, 1325–1339.
- TOMASZ, A., 1978, *Crossing of Cellular boundaries by nucleic acids in bacteria*. În : *Transport of macromolecules in cellular systems* (Silverstein S. C. ed.), Verlag Chemie GmbH Weinheim, p. 21–34.
- TRAUTNER, T. A., SPATZ, H. C., 1973, *Transfection in Bacillus subtilis*. Curr. Topics Microbiol. Immunol., **62**, 61–68.
- TRAVERS, A., 1971, *Control of transcription in bacteria*. Nature, New Biology, **229**, 69–74.
- TRAVERS, A., 1976, *RNA polymerase specificity and the control of growth*. Nature, **263**, 641–647.
- TRČKA, J., WILLINGER, H., 1973, *Eine vereinfachte Methode für Untersuchungen auf Colicinogenie*. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A **225**, 228–232.
- TURNER, M., 1980, *How trypanosomes change coats*. Nature, **284**, 13–14.
- VANDEGRIFT, V., 1979, *Recombinant ADN : Scientific and Social perspectives*. J. Chemical. Educ., **56**, 77–82.
- VAN ITERSON, W., GROEN, J. B., 1971, *Bacillus subtilis*. J. Cell. Biol., **49**, 553–560.
- VAN MONTAGU, M., HOLSTERS, M., ZAMBRYSKI, P., HERNALSTEENS, J., DEPICKER, A., DE BRUCKELEER, M., ENGLER, G., LEMMERS, M., WILLMITZER, L., SCHELL, J., 1980, *The interaction of Agrobacterium. Ti-plasmid DNA and plant cells*. Proc. R. Soc. Lond., **B 210**, 351–365.
- VIVAY SARATHY, P., SIDDIQI, O., 1973, *DNA synthesis during bacterial conjugation. I. Effect of mating on DNA replication in Escherichia coli*. J. Mol. Biol., **78**, 427–441.
- VON SENGBUSCH, P., 1979, *Molekular und Zellbiologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- WALDVOGEL, F., 1979, *Action des antibiotiques sur les membranes*. Helv. med. Acta, **36**, 385–408.
- WALKER, G. C., 1984, *Mutagenesis and inducible response to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli*. Microbiol. Rev., **48**, 60–93.
- WALL, J. D., WEAVER, R. F., GEST, H., 1975, *Gene transfer agents, bacteriophages and bacteriocins of Rhodopseudomonas capsulata*. Arch. Microbiol., **105**, 217–224.
- WALLACE, D. C., 1982, *Structure and evolution of organelle genomes*. Microbiol. Rev., **46**, 208–240.
- WALLACE, D. C., MOROWITZ, H. J., 1973, *Genome size and evolution*. Chromosoma, **40**, 121–126.
- WANG, J. C., 1980, *Superhelical DNA*. Trends Biochem. Sci., **219**–221.
- WANG, J. C., 1982, *Les enzymes qui modifient la topologie de l'ADN*. Pour la Science, **59**, 56–71.
- WARREN, R. A. J., 1980, *Modified bases in bacteriophage DNAs*. Ann. Rev. Microbiol., **34**, 137–158.
- WATANABE, T., 1978, *Infections drug resistance in bacteria*. Current Trends in Microbiol., **56**, 43–98.

- WATSON, J. D., 1968, *The double helix. A personal account of the discovery of the structure of DNA*. Atheneum, New York.
- WATSON, J. D., 1977, *Molecular biology of the gene*, ed. a 3-a W. A. Benjamin Inc., Menlo Park, S.U.A.
- WATSON, B., CURRIER, T. C., GORDON, M. P., CHILTON, M. D., NESTER, E. W., 1975, *Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol., **123**, 255—264.
- WEINERT, T. A., SCHAU, S. N. A., GRINDLEY, N. D. F., 1983, *Insertion sequence duplication in transpositional recombination*. Science, **222**, 755—765.
- WETTSTEIN, D., VON, 1983, *Genetic engineering in the adaptation of plants to evolving human needs*. Experientia, **39**, 687—713.
- WETZEL, R., 1980, *Application of recombinant DNA technology*. Amer. Sci., **68**, 664—676.
- WILLETTTS, N., 1972, *The genetics of transmissible plasmids*. Ann. Rev. Genetics., **6**, 257—268.
- WITKIN, E. M., 1976, *Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli*. Bacteriol. Rev., **1976**, 869—907.
- WORSE, C. R., 1971, *The biological significance of the genetic code*. Molecular and subcellular biology, vol. I, p. 5—41.
- WOESE, C. R., 1965, *Models for the evolution of codon assignments*. J. Mol. Biol., **43**, 235—240.
- WOESE, C. R., 1970, *The genetic code in prokaryotes and eukaryotes*. Symp. Soc. Gen. Microbiol., XX. "Prokaryotic and eukaryotic cell", p. 39—54.
- WOESE, C. R., 1973, *Evolution of the genetic code*. Naturwissenschaften., **60**, 447—459.
- WOLDRINGH, C. L., NANNINGA, N., 1976, *Organization of the nucleoplasm in Escherichia coli visualized by phase-contrast light microscopy, freeze fracturing and thin sectioning*. J. Bacteriol., **127**, 1455—1464.
- WOODWARD, D. O., WOODWARD, V. W., 1977, *Concepts of molecular genetics. Information flow in genetics and evolution*. Mc Graw-Hill.
- WORCEL, A., BURGIE, 1972, *On the structure of the folded chromosome of Escherichia coli*. J. Mol. Biol., **71**, 127—147.
- WORCEL, A., BURGIE, E., 1974, *Properties of a membrane-attached form of the folded chromosome of Escherichia coli*. J. Mol. Biol., **82**, 91—105.
- YOUNG, F. E., 1980, *Impact of cloning in Bacillus subtilis on fundamental and industrial microbiology*. J. Gen. Microbiol., **119**, 1—15.
- YOUNG, E. F., MAYER, L., 1979, *Genetic determinants of microbial resistance to antibiotics*. Rev. Infect. dis., **1**, 55—62.
- ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M., SCHELL, J., 1974, *Supercoiled circular DNA in crown-gall-inducing Agrobacterium strains*. J. Mol. Biol., **86**, 109—127.
- ZAMBRYSKI, P., HOLSTERS, M., KRUGER, K., DEPICKER, A., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., GOODMAN, H. M., *Tumor DNA structure in plant cells transformed by A. tumefaciens*. Science (S.U.A.), **209**, 1385—1391.
- ZAMENHOFF, S., EICHORN, H. H., 1967, *Studies of microbial evolution through loss of biosynthetic functions: establishment of defective mutants*. Nature, **300**, 143—149.
- ZARNEA, G., 1970, *Microbiologie generală*. Edit. Didactică și pedagogică, București.
- ZARNEA, G., 1983, *Tratat de microbiologie generală*. Vol. I, Edit. Academiei, București.
- ZARNEA, G., 1984, *Tratat de microbiologie generală*, vol. II, Edit. Academiei, București.
- ZARNEA, G., MENCINICOPSCI, G., BRAGAREA, S., 1980, *Bioingineria preparatelor enzimactice microbiene*. Edit. Tehnică, București.
- ZIPKAS, D., RILEY, M., 1975, *Proposal concerning the evolution of the genome of Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.), **72**, 1354—1358.

